

## ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу

**Баумкетнера Андрія Богдановича**

**“Нові аспекти згортання та агрегації білків:**

**Теорія та комп’ютерне моделювання”**,

представленої на здобуття наукового ступеня доктора фізико-математичних наук

за спеціальністю 01.04.24 – фізика колоїдних систем

Сучасний етап розвитку біології характеризується поглибленим вивченням структурних основ функціонування білків - основних робочих інструментів клітини - та формуванням міждисциплінарних підходів при структурно-функціональному аналізі білків та їх макромолекулярних комплексів. Однією з найважливіших проблем є вивчення молекулярних механізмів згортання – фолдинга білків, який забезпечує формування функціонально активних конформацій та реалізацію функцій білків. Слід зазначити, при порушеннях фолдингу білків формуються альтернативні конформації, які є частково розгорнутими або неправильними, що приводить до формування агрегатів білків. Агрегація білків в клітинах в свою чергу приводить до виникнення нейродегенеративних хвороб, таких як хвороби Альцгеймера, Паркінсона, які на сучасному етапі розвитку медицини є невиліковними. Отже, вивчення молекулярних механізмів фолдинга і агрегації білків, є однією з головних проблем сучасної біології і спрямоване на створення інгібіторів процесів агрегації білків як потенційних лікарських препаратів.

Важливою проблемою є також вивчення конформаційних переходів в білках, що відбуваються в межах згорнутого стану. Такі переходи відбуваються в моторних білках, які забезпечують скорочення м’язів, зокрема в білку міозині. Альтернативні конформації цього білка були встановлені експериментально, проте деталі функціонально важливого конформаційного переходу між ними залишаються невідомими. Оскільки спектроскопічні методи, які використовуються в дослідженнях таких білків, не мають достатньої роздільної здатності для описання всіх аспектів переходу, теоретичні підходи до цієї проблеми мають значну перспективу.

Велике значення має також вивчення колективної поведінки білків у розчині. В природніх умовах білки перебувають у водному середовищі при певній скінченній густині. Взаємодії між білками, що виникають в таких середовищах, приводять до появи низки нових явищ. В першу чергу необхідно відзначити фазове розшарування, внаслідок якого утворюються дві рідкі фази з великою та малою концентрацією білка. Теоретичний опис цього явища зустрічається з істотними викликами. Важливо в рамках однієї моделі одночасно описати як структуру, так і фазову діаграму розчину білка. Фізика конденсованого середовища вивчає поведінку складних систем із сильним зв'язком між складовими частками. При цьому доводиться аналізувати поведінку всієї системи в цілому і як результат замість руху окремих часток розглядаються колективні коливання. Білки в нативному, функціональному стані також характеризуються колективною поведінкою окремих структурних елементів і корельованими конформаційними рухами. Проте слід зазначити, що така поведінка спостерігається тільки для нативних білків. При порушенні просторової структури білків, тобто їх денатурації корельовані конформаційні рухи втрачаються.

Іншим наслідком взаємодії між білками може бути утворення агрегатів. На відміну від густої фази, що виникає в процесі фазового розшарування, агрегати є нерозчинними та утворюються з білків у розгорнутому стані. Найбільш відомими серед них є амілоїдні фібрили, які зустрічаються в мозку пацієнтів з різноманітними нейродегенеративними розладами. Незважаючи на значний науковий інтерес протягом останнього часу, фібрили залишаються все ще недостатньо вивченими. Існує ціла низка

питань стосовно фібрил, які потребують відповідей. По-перше, якою є структура фібрил? Чим вона визначається? По-друге, як середовище впливає на формування фібрил? По-третє, яким є вплив мутацій пов'язаних із вродженими формами хвороб на фібрили? Цей список можна було б продовжити, але і в теперішньому вигляді він добре демонструє масштаб задач, які стоять перед дослідниками.

В зв'язку з цим дисертаційна робота **Андрія Богдановича Баумкетнера** безсумнівно є актуальною і повністю відповідає сучасним тенденціям в розвитку молекулярної біології, біофізики та колоїдної хімії.

Дисертаційна робота виконана в Інституті фізики конденсованих систем НАН України. Представлені в дисертації результати отримані згідно планів робіт в рамках бюджетних тем НАН України: “Немарківські кінетичні та гідродинамічні процеси у конденсованих системах (2002-2004 рр., № держреєстрації 0102U000216)”, “Розвиток та застосування статистико-механічних підходів у теорії складних рідин (2005-2007 рр., № держреєстрації 0105U002082)”, “Статистико-механічні та комп'ютерні дослідження властивостей складних рідин (2008 р., № держреєстрації 0108U001153)”, “Розвиток теорії складних плинів і міжфазних областей: фазова поведінка, структурні, термодинамічні та динамічні властивості (2009 – 2013 рр., 0109U001058 )”, “Багатомасштабність і структурна складність конденсованої речовини: теорія і застосування (2013-2016 рр., 0112U003119)”, “Вплив молекулярної структури і процесів локального впорядкування на фізичні властивості багаточастинкових систем (2014-2018 рр., 0114U001048)”, “Нові концепції статистичного опису і їх застосування у теорії багаточастинкових систем (2017-2018 рр., 0117U002093)”. Автор також брав участь у виконанні програмно-цільової та конкурсної тематики НАН України за темами: “Західний грид-центр УНГ: розвиток технічного потенціалу, комп'ютерне моделювання у грид-середовищі та підготовка кадрів. Етап 1(2014 р., 0114U002631), Етап 2 (2015 р., 0115U001291), Етап 3 (2016 р., 0116U005785), Етап 4 (2017 р., 0117U000954)”.

Дисертаційна робота складається зі вступу, шести розділів, перший з яких містить огляд літератури, наступні 5 представляють результати оригінальних досліджень, висновків, списку цитованих джерел та додатку. Роботу викладено на 348 сторінках тексту, бібліографічний список містить 443 посилання.

**Вступ** побудовано згідно встановлених вимог щодо дисертаційних робіт і відповідно до змісту автореферату, всі підрозділи викладено лаконічно та чітко. Автором висвітлено стан проблеми, необхідність та актуальність дослідження, обґрунтовано та сформульовано мету дисертаційної роботи.

У **розділі 1** представлено огляд літератури, в якому проведено детальний аналіз проблеми дисертаційного дослідження та висвітлені останні досягнення в цій галузі. В огляді детально описана фазова поведінка білків. Підкреслено, що вагомих результатів вдалося досягнути на основі моделей, розроблених у фізиці колоїдів, зокрема моделі Дерюгіна-Ландау-Верві-Овербека. Ця модель останнім часом модифікована на основі параметризації результатів експериментів малокутового рентгенівського та нейтронного розсіяння. Проаналізовано дані по утворенню білкових кластерів, які є прикладом самоорганізації білкових структур та мають перспективи для практичного застосування. Приведено опис сучасних поглядів на механізми фолдингу білків та ролі шаперонів у процесі їх згортання. Проаналізовано проблеми, що виникають у експериментальних і теоретичних підходах для з'ясування ролі шаперонів. При опису даних процесів агрегації білків акцент робиться на моделях з атомним наближенням. Детально описані структурні переходи моторного білка міозину, які забезпечують скорочення м'язів. Висвітлено також теоретичні методи вивчення реакції агрегації на прикладі згортання пептиду, пов'язаного з хворобою Альцгеймера, та розглянуто проблеми утворення амілоїдних фібрил. В кінці цього розділу приведені висновки. Проте, на думку рецензента висновки до цього розділу є надто лаконічними. Необхідно було представити

висновки подати у більш розширеному вигляді, що є необхідним для формулювання завдань дисертаційного дослідження та шляхів їх вирішення.

**Розділ 2** дисертаційної роботи присвячений дослідженню колективної поведінки білків. Метод інверсії Больцмана у поєднанні з методом молекулярної динаміки застосовано до експериментального статичного структурного фактора білка лізоциму у водному розчині для виведення потенціалу міжмолекулярної взаємодії. Показано, що отриманий потенціал, який описує взаємодію двох колоїдних частинок сферичної форми, має м'яке відштовхування на коротких відстанях і притягальну яму на проміжних відстанях. Зі збільшенням густини, цей потенціал приводить до фазового переходу типу рідина-рідина. Критичні параметри цього переходу, однак, погано узгоджуються з експериментом. Встановлено, що несферична модель краще підходить для опису розчину лізоциму. Крім структури, на якій ґрунтується виведення, така модель також дозволяє правильно описати фазову діаграму. Таким чином, в дисертаційній роботі вперше отримано модель білка, яка працює на різних просторових масштабах.

В дисертаційній роботі А.Б.Баумкетнера показано, що системи, які взаємодіють через глобально відштовхувальний потенціал з локальним мінімумом на коротких відстанях, утворюють рівноважні кластери - мультимери різного розміру, які з'являються у простих колоїдних суспензіях внаслідок самоасоціації колоїду та перебувають у рівновазі з мономерами. Проведено детальний порівняльний аналіз з двома іншими типами, які включають потенціали з глобальним мінімумом і відштовхувальним хвостом, що виникають внаслідок конкуренції короткосяжного притягання й далекосяжного відштовхування, та суто відштовхувальні потенціали, що мають м'яке плече. Показано, що нові кластери мають видовжену форму та підтверджено ентропійний механізм утворення при малих густинах білка, та формування компактних кластерів при великих густинах.

В **розділі 3** досліджено процес згортання білка що відбувається за посередництва молекулярного шаперона GroEL/ES. Проведено аналіз внутрішньої комірки шаперона, яка має як відштовхувальні так і притягальні стінки. Виявлено, що вплив комірки сильно залежить від рівня фрустрації поверхні вільної енергії білка. Автором показано, що комірки з відштовхувальними стінками можуть прискорювати згортання білків з гладкими поверхнями, що мають мінімальний рівень фрустрації. Встановлено, що механізм прискорення полягає у механічному відсіканні конформацій з великим радіусом гірації, що потрапляють у локальний мінімум потенціальної енергії. Притягальні стінки комірки, з іншого боку, демонструють ширший спектр поведінки. Крім обмежень на ансамбль розгорнутого стану, комірка здатна тимчасово утворювати комплекс з білком у невірні згорнутих конформаціях. За рахунок цього відбувається прискорення процесу згортання білків. Отриманий дисертантом результат дозволяє запропонувати новий механізм функціонування шаперонів у процесі згортання білків.

В **розділі 4** запроваджено нову модель скороченого опису для дослідження процесу агрегації білків. Модель досліджено для пептидів поліаланіну, для яких вона правильно описує тенденцію до посилення агрегації з розміром пептидного ланцюга. Додатково досліджено вплив зовнішнього електричного поля та показано, що поле стимулює перехід в спіральний стан та може спричинити розпад фібрил.

Одним з найбільш важливих результатів дисертаційного дослідження є створена автором модель для симуляції молекулярної динаміки пептидів та їх комплексів на основі схеми парної ефективної взаємодії RAPID (Reduced Atomic Pair-Interaction Design). Запропонована модель використовує атомну архітектуру білка та стандартне силове поле. Електростатична складова  $\Delta G_{el}$  вільної енергії сольватації враховується через дистанційно-залежну діелектричну сталу. Всі інші складові повної енергії сольватації, яка включає в себе неполярну енергію та можливі похибки в  $\Delta G_{el}$ , представлена парними потенціалами взаємодії, прикладеними до гідрофобних фракцій пептиду. За результатами обчислювань, виконаних з використанням цієї моделі,

встановлено, що запропонована модель може бути успішно застосована для комп'ютерного моделювання процесів агрегації білків.

В розділі 5 дисертаційної роботи представлено результати вивчення структурних переходів м'язового білка міозину. Ключовий структурний перехід білка міозина приводить до переходу в активну поствідновлювальну конформацію, яка здатна генерувати силу. Дослідження включало кілька етапів. Спочатку було показано що стрибок відновлення - це двокроковий процес, який складається з двох етапів, розділених часовим інтервалом. Безпосередньо в симуляціях спостерігався перший етап, при якому петля ключа II закривалась за присутності АТФ в центрі зв'язування нуклеотидів. При цьому отримана конфігурація ділянки, що взаємодіє з нуклеотидами, була ідентичною до конфігурації, що визначена експериментально. Добре узгодження з експериментом спостерігалось також для розподілу міжзалишкових відстаней в області генерації сили. Досліджено також другий етап структурного переходу, який включає поворот домену-конвертора. Для цього шляхом комбінаторного пошуку було встановлено основні структурні компоненти білка з області генерації сили, які відповідають за появу двох кутів повороту. Встановлено, що перехід між двома станами контролюється спіраллю SH1, розташованою поруч з релейною спіраллю та релейною петлею. Виявлено, що зсув у позиції SH1 у напрямку від релейної спіралі викликає перехід від одного стану до іншого. Перехід контролюється кластером гідрофобних залишків I687, F487 та F506, які роблять значний внесок у стабільність обох станів. Важливо підкреслити, що спостережуваний механізм добре узгоджується з наявними структурними та мутаційними дослідженнями.

Розділ 6 дисертаційної роботи присвячений теоретичному дослідженню агрегації фібрил в атомних підходах. При цьому було досліджено 2 системи: повнорозмірний пептид хвороби Альцгеймера А $\beta$  та його фрагмент. На першому етапі було досліджено вплив мутації E22Q, яка суттєво змінює заряд пептида, на ріст амілоїдних фібрил пептиду хвороби Альцгеймера А $\beta$ . Існує гіпотеза, що пришвидшена агрегація лежить в основі патогенезу вродженої "Голландської" форми хвороби, пов'язаної з цією мутацією. Як модель процесу агрегації, розглянуто осідання мономерного А $\beta$  на край існуючої фібрили. Часовий масштаб цього процесу контролюється бар'єром вільної енергії, що відповідає структурному переходу пептиду від конформацій мономерного стану до конформацій перехідного стану. Для вивчення конформацій мономерного стану, з яких відбувається початкове стикування пептиду з фібрилою, були використані фрагменти А $\beta$  різної довжини. В ході комп'ютерного моделювання було встановлено, що мутація E22Q зменшує бар'єр вільної енергії для процесу осідання пептиду, що приводить до його прискорення. Термодинамічні ознаки цього ефекту добре узгоджуються з експериментальними спостереженнями.

На другому етапі роботи було проведено дослідження фібрилоутворення фрагменту А $\beta$  пептиду, що містить залишки 11-25. Цей фрагмент відомий тим, що змінює регістр  $\beta$ -листів зі зміною рН середовища фібрили. В роботі дисертантом було побудовано мікроскопічні моделі фібрили, для яких вільна енергія була оцінена за допомогою теорії неявного розчинника. Проведені оцінки показали, що регістр моделей з найнижчою вільною енергією добре узгоджується з експериментальними спостереженнями. Це дуже важливий результат, який демонструє достатню точність вибраної моделі. Встановлено, що в нейтральному середовищі основним внеском у різницю вільної енергії між двома регістрами є електростатична взаємодія. Зокрема, група зарядів карбоксильного кінця пептида дає великий внесок у ці взаємодії і грає ключову роль у визначенні регістру.

Дисертаційна робота завершується висновками, які чітко підкреслюють значний вклад дисертанта у вирішення фундаментальних проблем сучасної молекулярної біології, а саме механізмів фолдинга білків та молекулярних основ агрегації білків, яка є причиною виникнення ряду нейродегенеративних захворювань людини.

Дисертаційна робота виконана на високому методичному рівні з використанням сучасних підходів та містить цілу низку нових наукових результатів. Поряд з тим, в ній є певні недоліки. Особливо потрібно звернути увагу на наступні недоліки роботи:

1. В дисертаційній роботі відсутній окремий розділ «Матеріали і методи», проте в кожному розділі є короткий опис методів, моделей та технічних деталей. При цьому методи дослідження описані дуже стисло, надто лаконічно, що затруднює аналіз отриманих результатів.
  2. В роботі не вказано, яка версія програмного пакету “GROMACS” використовувалась автором при проведенні симуляцій молекулярної динаміки. Також чомусь не приведена характеристика комп’ютерних систем, що були використані дисертантом та окремі деталі розрахунків.
  3. Викликає деякий подив ремарка дисертанта про обмеженість комп’ютерних ресурсів для проведення досліджень. В той же час дисертант не згадує про комп’ютерні ресурси Українського національного гріду, які на теперішній час є досить розвиненими. Зокрема, в рамках віртуальної лабораторії “MolDynGrid”, створеної в Інституті молекулярної біології і генетики НАН України, можна проводити детальний аналіз траєкторій молекулярної динаміки білків та їх кореляцію з експериментальними даними мультимімерної ЯМР-спектроскопії.
  4. При інтерпретації і обговоренні результатів дисертант не розглядає концепцію існування природно неструктурованих білків, які були порівняно недавно відкриті за допомогою ЯМР-спектроскопії. На теперішній час мультимімерна ЯМР-спектроскопія є потужним і інформативним методом дослідження просторової структури білків у розчині та їх динаміки.
  5. В розділі 4 дисертант використовує термін “притягальна стінка комірки шаперона”, що є не досить вдалим. Ділянки зв’язування білка в порожнині шаперону в процесі його згортання відомі і можуть бути описані з точки зору її будови, полярності та ролі окремих амінокислотних залишків.
- Є також зауваження по оформленню дисертації:
1. Автор вводить невдале скорочення АСМ (с.54), - це скорочення вже широко використовується для атомно-силової мікроскопії.
  2. На стор.57 використовується назва білка rhodanese англійською мовою, а не українською.
  3. В дисертації використовується невдалий вираз «димер  $\beta$ -нитки» (с.284). Термін димер є коректним для взаємодії окремих субодиниць білка, а не для взаємодії невеликих фрагментів в субодиниці білка. Крім того, замість терміну  $\beta$ -нитка в науковій літературі зараз використовують термін  $\beta$ -стренд.

Слід зазначити, що наведені зауваження не є принциповими, мають характер побажань та перспектив подальших досліджень і не впливають на загальну високу оцінку дисертаційної роботи.

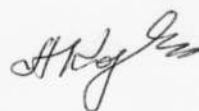
Отже, дисертаційна робота “Нові аспекти згортання та агрегації білків: Теорія та комп’ютерне моделювання” є закінченим актуальним науковим дослідженням, в якому успішно вирішено ряд принципово нових задач. Проведені у дисертації дослідження повністю відповідають спеціальності 01.04.24 – фізика колоїдних систем. Основні результати дисертації опубліковані в 34 наукових публікаціях, в тому числі в 23 статтях у фахових наукових журналах, що належать до списку журналів, у яких мають бути опубліковані матеріали дисертаційних досліджень зі спеціальності групи 01.04 – фізика. Усі викладені в дисертації оригінальні результати отримані за безпосередньої участі здобувача. Дисертація виконана на високому методичному рівні, матеріали досліджень дисертанта були представлені на багатьох наукових симпозиумах. Автореферат дисертації повністю відображає її зміст. Отримані в дисертаційній

роботі висновки мають фундаментальне значення і суттєво розширюють наші уявлення про молекулярні основи функціонування білків та їх порушення при нейродегенеративних захворюваннях.

Вважаю, що за актуальністю теми, новизною та значущістю результатів дисертаційна робота "Нові аспекти згортання та агрегації білків: Теорія та комп'ютерне моделювання" повністю відповідає всім вимогам "Порядку присудження наукових ступенів" затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24 липня 2013 року №567, а її автор **Андрій Богданович Баумкетнер** безумовно заслуговує присудження йому наукового ступеня доктора фізико-математичних наук зі спеціальності 01.04.24 - фізика колоїдних систем.

**Офіційний опонент:**

член-кореспондент НАН України,  
доктор біологічних наук, професор  
завідувач відділу білкової інженерії та біоінформатики  
Інституту молекулярної біології і генетики НАН України



О. І. Корнелюк

