

## ВІДГУК

Офіційного опонента на дисертаційну роботу А.Б. Баумкетнера  
**“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 – фізики колоїдних систем

В дисертації роботі А.Б. Баумкетнера досліджено властивості білкових структур, які утворюються в живих організмах під впливом різноманітних природних факторів. Як відомо, генетична інформація клітини задає склад та лінійну послідовність амінокислотних залишків білка. Але для виконання своїх біологічних функцій, білки повинні перебувати у спеціальних тривимірних станах, відомих як природні стани. Будь яка помилка в просторовій організації білка призводить до мутації і, відповідно, негативних наслідків у процесах його функціонування.

Перехід з випадкового неструктурованого стану, в якому білки знаходяться після синтезу, у природний стан називається процесом згортання. На цьому етапі ланцюжок білка розділяється на  $\alpha$ -спіральні упорядковані фрагменти та неупорядковані  $\beta$ -листи. На наступних етапах відбувається агрегація макромолекули в природну структуру даного білка, яка виникає внаслідок утворення і наступної взаємодії білкових доменів і завершується утворенням агрегату, який може бути частково або повністю структурованим.

Процеси згортання та агрегації білка складаються з декількох етапів, які фактично не простежуються в експериментальних дослідженнях з-за великої кількості (звичайно тисячі) атомів в структурі білка. Тому певні частини механізму функціонування білка залишаються поза увагою, що в значній мірі гальмує розуміння перебігу біологічних процесів в організмах.

Важливі питання про те, яким чином утворюється складна тривимірна структура білка та як вона виконує свої біологічні функції для багатьох білків залишаються ще не вирішеними. Гарним прикладом такої ситуації є визначення ролі малих білків-шаперонів, яка експериментально встановлена для згортання певних неупорядкованих фрагментів білків, але механізми дії шаперонів залишаються не з'ясованими в багатьох випадках. Іншим прикладом є амілоїдні фібрили, які виникають у мозку пацієнтів з хворобою Альцгеймера, чи за подібних нейродегенеративних розладів. Для того, щоб з'ясувати роль фібріл у виникненні хвороби необхідно встановити фізичні принципи, які лежать в основі їх структури та утворення. Ці та інші важливі задачі знаходилися у центрі уваги дисертаційної роботи.

Дослідження білків дуже активно ведуться в усьому світі. В розвинутих країнах, що належать до Організації економічного співробітництва та розвитку, з метою вивчення поведінки білків створені цілі наукові установи. До цієї категорії, наприклад належить Інститут досліджень

білка в університеті Осаки, Японія. В країнах, що розвиваються, таких як блок BRICS, що включає Бразилію, Росію, Індію, Росію та Південну Африку, дослідження білків теж стоїть на дуже високому рівні. Для прикладу в одному лише Інституті білка РАН в Пущино, працює порядку 200 наукових працівників. Така ж тенденція спостерігається і в Європі. Наприклад у Франкфурті-на-Майні в Інституті біофізики біля 90% науковців займаються проблемами білків та їх комплексів

Важливість та актуальність досліджень структуроутворення білків підкреслюється і тим фактом, що наприкінці минулого сторіччя був створений спеціальний банк структур білків та нуклеопротеїнів (Protein Data Bank), де зібрані практично всі результати структурних досліджень білків.

Але структурна інформація потребує аналізу, і тому для розуміння перебігу процесів, які призводять до зміни та умов стабілізації отриманих структур необхідні комп'ютерні дослідження. За великої кількості амінокислот та необхідності опису взаємодій їх атомів та атомних груп в складних макромолекулярних комплексах в умовах колоїдних розчинів вирішення задачі передбачення білкової структури та її змін методами теоретичної фізики *ab initio* виконати не можливо.

В останні роки спостерігається стрімкий прогрес в теоретичних дослідженнях білків пов'язаний з розробкою нових ефективних методів моделювання білкових структур. Дисертаційна робота дуже гарно ілюструє розвиток цього напрямку. Запропоновані в роботі моделі, наприклад RAPID, дозволяють проводити аналіз процесу агрегації за розумних витрат комп'ютерного часу на рівні, наближеного до атомарного. Також досягненням роботи є моделі скороченого опису для дослідження структурних переходів білка, які за правильного вибору домінантних ступенів вільності системи значно скорочують час моделювання, не знижуючи суттєво точність отриманих результатів.

Дисертаційна робота складається з шести розділів. **Перший розділ** присвячений огляду літератури, тоді як інші п'ять – містять оригінальні дослідження. В першому розділі коротко описано відомі з літератури основні досягнення, що стосуються дослідження згортання та агрегації білків методами комп'ютерного моделювання. Розділ містить достатньо інформації для того, щоб визначити значимість результатів дисертації.

В **другому розділі** показано, що проблема розрахунку фазових діаграм білкових розчинів зустрічається з багатьма викликами. Потенціали міжбілкової взаємодії, отримані з експериментальної структури розчину лізоциму, дають незадовільну фазову поведінку. Значення критичної густини та температури, отримані з їх допомогою, перевищують експериментальні відповідники принаймні вдвічі. Щоб усунути ці розбіжності запропоновано несферичну модель білка, яка є більш складною та має більше ступенів вільності, ніж сферична модель. З відповідним вибором потенціалів показано, що вперше, і структура, і фазова діаграма розчину білка лізоциму можуть бути правильно відтворені в рамках однієї моделі.

Встановлено, що існує третій тип систем, здатних утворювати рівноважні кластери, крім двох інших, що були відомі раніше. В новому типі частинки взаємодіють через глобально відштовхувальний потенціал, який має локальний мінімум на коротких відстанях. Кластери що утворюються таким потенціалом змінюють свою статистику при зміні густини системи. При малих густинах нові кластери мають видовжену форму і ентропійний механізм утворення, а при великих - компактну форму та ентальпійну природу.

**У третьому розділі**, для тих білків, які не здатні згортатися самостійно і потребують допомоги шаперонів, досліджено вплив комірки шаперона на процес згортання. Дослідження проведено для білка з природним станом у формі  $\alpha/\beta$  сендвіча, оскільки такі конформації найбільш часто зустрічаються серед субстратів шаперонів. Проаналізовано два типи поверхонь комірки: відштовхувальну та притягальну. У випадку відштовхувальної комірки з'ясовано, що її вплив на кінетику згортання сильно залежить від ступеня фрустрації поверхні вільної енергії білка. Для сильно фрустрованих моделей пришвидшене згортання не спостерігається. Цей висновок свідчить на користь коміркової моделі роботи шаперона, в якій комірка виконує пасивну роль, захищаючи білок від шкідливих взаємодій з іншими білками, що можуть привести до агрегації. Для притягальної стінки, навпаки, встановлено, що комірка може відігравати активну роль, безпосередньо впливаючи на процес згортання. Показано, що можливо знайти такі параметри системи, за яких згортання всередині комірки може протікати принаймні на порядок величини швидше. Важливо підкреслити, що спостережуваний механізм пришвидшення добре узгоджується з моделлю ітеративного відпалу для шаперонів і полягає у створенні альтернативних шляхів згортання завдяки утворенню комплексів білка з шапероном.

**В четвертому розділі** запроваджено підхід (RAPID) до моделювання великих білків та білкових комплексів з атомною точністю, в якому використовується парний розклад вільної енергії сольватациї. В рамках цього підходу з вихідних функцій парного розподілу амінокислотних залишків отримуються ефективні потенціали, що імітують наявність розчинника. Показано, що така модель правильно відтворює згортання короткого, повністю аланінового пептиду з 10 амінокислотними залишками. Під час тестування систем із кількома ланцюгами в комірці симулляції, модель передбачила, що довші пептиди на основі аланіну самоорганізуються в  $\beta$ -листові структури, що нагадують амілоїдні фібрили, більш легко, ніж коротші, у добром узгодженні з експериментом. Показано, що електричне поле здатне індукувати перехід у спіральний стан у переважно невпорядкованих системах. Як наслідок зсуву заселеності в бік спірального стану, відбувається дисоціація попередньо сформованих  $\beta$ -листів. Цей результат особливо значимий, оскільки він відкриває шлях для контролю над процесом агрегації за допомогою електричного поля.

**П'ятий розділ** присвячений дослідженню структурного переходу в білку міозину від перед-відновлювального стану  $M^*$  до пост-

відновлювального стану  $M^{**}$ , відомого як стрибок відновлення. Основним результатом тут є те, що шляхом моделювання повної головки міозину встановлено, що перехід містить як мінімум два послідовні кроки. Перший крок полягає в замиканні ключа II, який знаходиться на великій відстані від області генерації сили. Другий крок – це поворот домена конвертора. Для цього кроку побудовано окрему розрахункову модель, яка складається із кількох сегментів білка та досліжується в моделюванні з явним розчинником. Сегменти обрано за результатами комбінаторного пошуку з умовою, що вони відтворюють дві конфігурації релейної спіралі,  $M^*$  і  $M^{**}$ . В результаті отримано модель скороченого опису, яка є набагато меншою за повний білок, проте так, як і він, має два функціональні стани. Дано модель містить критично важливу частину білка і може використовуватись для досліджень впливу на неї різноманітних зовнішніх чинників, зокрема мутацій.

Процес утворення амілоїдних фібріл досліджено у **шостому розділі**. Використовуючи моделювання в явному розчиннику, спочатку розглянуто проблему адсорбції мономерного А $\beta$  на край існуючої фібрили. Структури перехідного стану для цього процесу отримано з моделювання десорбції мономера. Конформаційні стани, спостережувані в моделюванні фрагментів А $\beta$ , що містять структурно важливі області, використано для обрахунку висоти бар'єру вільної енергії для процесу адсорбції. Подібні розрахунки проведено для фрагмента з мутацією E22Q, яка відповідає голландській формі вродженої хвороби Альцгеймера. Бар'єр вільної енергії для мутованого пептиду виявився нижчим, ніж у пептиду дикої послідовності, що свідчить про більш стрімкий процес агрегації. Передбачене теоретично прискорення добре узгоджується з експериментальними спостереженнями. Більше того, як в теорії так і в експерименті, прискорення має ентропійну природу.

Структуру фібрили побудовано для фрагмента А $\beta$ 11-25. Відомо, що регистр  $\beta$ -листів цих фібріл змінюється зі зміною pH середовища. Щоб пояснити мікрокопічне походження pH залежності регистра побудовано декілька структурних моделей для фібріл при низьких та нейтральних значеннях pH та досліджено в короткій молекулярній динаміці в явній воді. Моделі, що показали найнижчу вільну енергію, оцінену за допомогою неявної моделі розчинника, обрано як зразки структури справжньої фібрили. Показано, що регистр цих моделей збігається з експериментальними спостереженнями. В нейтральному середовищі основним внеском у різницю вільної енергії між двома регистрами є електростатична взаємодія. Група зарядів карбоксильного кінця робить великий внесок у ці взаємодії і, отже, грає ключову роль у визначенні регистра.

Дисертаційна робота А.Б. Баумкетнера написана на високому професійному рівні. Частина з представлених результатів вже знайшли застосування. Як показує, наприклад, публікація в *Scientific Reports*, 2017, 2726, doi:10.1038/s41598-017-02609-z, електричне поле вже починають використовувати з метою контролю над процесом агрегації в

нанозастосуваннях, як запропоновано дисертантом ще у 2014 році. Інші результати роботи мають знайти застосування в наступні роки.

Разом зі здобутками, є в роботі і певні недоліки, на які дисертанту потрібно звернути увагу. Вважаю за потрібне зробити наступні **зауваження**:

1)Красивим і цікавим результатом є опис фазової поведінки ліцозиму у розчині (2-й розділ) з експериментальною точністю. Але розгляд цього ефекту міг би бути значно повнішим і фізично зрозумілішим, якщо би автор врахував, що ліцозим це глобулярний білок з двома слабко зв'язаними глобулами. Тобто, структура цього білка відносно м'яка, і має внутрішні ступені вільності, а його форма не є сферичною. Врахування внутрішніх коливальних мод та їх визначення в спектрах має дати незалежний інструмент для спостереження тої, чи іншої фази в білковому розчині.

2)Цікавим для фізики є опис поведінки білків у зовнішньому електричному полі. Зокрема, залежність загального дипольного моменту пептиду від напруженості поля (4.13) на певних інтервалах напруженості поля практично співпадає з відомим ефектом орієнтації диполів у магнітному полі. Але фізика дії поля на конформаційний стан пептидів і спостережений ефект дезагрегації  $\beta$ -листів потребує пояснень, адже в реальних білках як орієнтація пептидних груп так і  $\beta$ -листів не є довільною і залежить від структурних особливостей організму. Тому запропонований механізм було б добре пояснити на простій фізичній моделі поведінки декількох диполів в полі.

3)Вживання багатьох позначень для фрагментів білків та їх мутацій не робить дисертаційну роботу більш прозорою з точки зору фізики розглянутих систем. Окрім того, виникають питання, чому не досліджено як зазначені зміни послідовності амінокислот призводять до суттєвої зміни у функціонуванні білків

4)Дисертаційна робота з-за великого об'єму представленого матеріалу в деяких місцях виглядає недописаною. Так, наприклад, у тексті афтореферату і в дисертації відзначається, що "білки це один із трьох основних типів біологічних молекул". По-перше, які ще два типи мається на увазі автор не пояснює, а по-друге до основних типів відносять більшу кількість молекул, зокрема – ДНК, РНК, ліпіди, полісахариди, а також воду, яка приймає безпосередню участь у всіх біологічних процесах. Відзначу, що з необхідністю врахування ролі води погоджується і сам автор дисертації (стр.175).

Однак зроблені зауваження ніяк не впливають на загальну позитивну оцінку дисертаційної роботи. Робота добре написана і оформлена. В цілому, дисертація А.Б. Баумкетнера складає гарне враження, а проведені у дисертації дослідження відповідають спеціальності 01.04.24. Основні результати дисертації опубліковано в 23 статтях в міжнародних фахових журналах, що належать до списку журналів, де можуть бути опубліковані матеріали дисертаційних досліджень зі спеціальності групи 104 – фізика та астрономія, природничі науки. Усі викладені в дисертації оригінальні

результати отримано за безпосередньої участі здобувача. Автореферат дисертації повністю відображає її зміст.

Вважаю, що дисертаційна робота "Нові аспекти згортання та агрегації білків: теорія та комп'ютерне моделювання" задовольняє усім вимогам "Порядку присудження наукових ступенів", затверженого постановою Кабінету Міністрів України від 24 липня 2013 року № 567, а її автор Андрій Богданович Баумкетнер безперечно заслуговує присудження йому наукового ступеня доктора фізико-математичних наук зі спеціальності 01.04.24 - фізики колоїдних систем.

Доктор фізико-математичних наук,  
головний науковий співробітник  
Інституту теоретичної фізики  
ім. М. М. Боголюбова НАН України  
завідувач лабораторії біофізики макромолекул  
старший науковий співробітник

  
С.Н. Волков

Підпис доктора фіз.-мат. наук  
С.Н. Волкова засвідчує

Вчений секретар  
Інституту теоретичної фізики  
ім. М. М. Боголюбова НАН України  
кандидат фіз.-мат. наук

  
27.04.2018р.

С.М. Перепелиця