

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу

БАУМКЕТНЕРА Андрія Богдановича

«**НОВІ АСПЕКТИ ЗГОРТАННЯ ТА АГРЕГАЦІЇ БІЛКІВ:**

ТЕОРІЯ ТА КОМП'ЮТЕРНЕ МОДЕЛЮВАННЯ»,

подану на здобуття наукового ступеня доктора фізико-математичних наук

за спеціальністю 01.04.24 – фізика колоїдних систем

у спеціалізовану вчену раду Д 35.156.01

при Інституті фізики конденсованих систем НАН України

Докторська дисертація **Баумкетнера Андрія Богдановича** присвячена актуальній міждисциплінарній темі – розробці молекулярних моделей агрегації та згортання полімерів на прикладі різних за структурою та мономерним складом біологічних полімерів – білків. Створення моделей, які мають загальну природу і адекватно описують колективну поведінку колоїдних систем, та засобів реалізації цих моделей за допомогою методів комп'ютерного експерименту є, безумовно, актуальною проблемою сучасної фізики колоїдних систем та молекулярної біофізики.

Однією з центральних проблем фізики колоїдних систем є утворення кластерів та агрегація або процеси самоорганізації. Один з найцікавіших прикладів колоїдних систем, в яких спостерігаються ці явища, є білкові системи, в яких спостерігаються: агрегація у розчинах; згортання (фолдінг) або переходи з неструктурованих у природні стани; формування впорядкованих агрегатів – фібрил. Загалом існує дуже велике коло питань і задач щодо вивчення колективної поведінки для білків, відповіді на які на даний час відсутні. Так, на даний час бракує інформації про надійні типи потенціалів взаємодій, за допомогою яких можна коректно описати утворення агрегатів, зокрема, рівноважних кластерів в колоїдних системах, в тому числі, в розчинах білків, та термодинамічні фактори, що контролюють їх збірку. Побудова молекулярних моделей, за допомогою яких можна досліджувати та контролювати процеси формування агрегатів та кластерів у колоїдних системах, в тому числі білків, має також прикладне значення як один з перспективних засобів адресної доставки ліків.

Розуміння принципів, що лежать в основі згортання білків за допомогою шаперонів, на теперішній час теж не є задовільним. Існують дві моделі згортання білків у комірці шаперонів, але яка краще узгоджується з експериментом і наскільки вона є універсальною, в даний час не з'ясовано.

Особлива увага в останній час приділяється дослідженню процесів агрегації білків, які приводять до утворення впорядкованих структур амілоїдних фібрил. Науковий інтерес до таких олігомерних самоасоціатів існує завдяки зв'язку між утворенням амілоїдних фібрил та хворобами головного мозку (хвороба Альцгеймера, Паркінсона та інші нейродегенеративні розлади). Встановлення загальних фізичних принципів утворення таких фібрил є підставою для можливості контролювати ці процеси, наприклад, з'ясувати вплив зовнішнього середовища на структуру та особливості формування фібрил.

Таким чином, актуальною задачею є розробка молекулярних моделей фібрил та засобів реалізації їх дослідження в рамках комп'ютерного експерименту.

Створення автором при виконанні дисертаційної роботи саме таких моделей та методів їх реалізації і верифікації є своєчасним кроком до подальшого розвитку одного з найсучасніших напрямків фізики колоїдних систем та молекулярної біофізики. Тому тема дисертаційної роботи не лише актуальна та важлива з точки зору фундаментальної науки, але є своєчасною для прикладних галузей – нанотехнології, біотехнології, медицини – і покликана прислужитися практиці.

Метою досліджень **Баумкетнера А. Б.** був розвиток нових теоретичних методів та моделей для з'ясування фізичних механізмів, що лежать в основі згортання та агрегації білків. Дисертант сформулював критерії вибору завдань дисертаційних досліджень та окреслив коло конкретних проблем, які необхідно виконати для досягнення загальної мети роботи.

Постановка задач, що вирішувались при виконанні дисертації, була спрямована на отримання нових наукових результатів. Дійсно, висновки, які зроблено на підставі даних досліджень та їх вичерпного аналізу у кожному з розділів, свідчать про те, що вони є новими у галузі фізики процесів агрегації та фолдінгу білків.

Насамперед, в роботі сформульовано принципово нові уявлення про потенціали міжчастинкових взаємодії, що є загальними за своєю природою, за допомогою яких можливо вирішити проблему опису фазового розшарування в водних розчинах та утворення кластерів не тільки у випадку білків та поліпептидів, але й для багатьох наносистем. З запровадженими автором новими потенціалами на прикладі лізоциму, як найбільш експериментально дослідженого білка, показано, що і структура, і фазова діаграма його розчину відтворюються коректно.

Серед найбільш цікавих та вагомих результатів дисертації слід відзначити створену автором модель для симуляції довгих пептидів та їх комплексів на основі схеми парної ефективної взаємодії RAPID (Reduced Atomic Pair-Interaction Design). За результатами обчислювань, виконаних з використанням цієї моделі, обґрунтовано, що запропонована модель є придатною для комп'ютерного моделювання агрегації білків. Ця модель також успішно застосована для дослідження впливу зовнішнього електричного поля на агрегацію білків.

Дисертаційна робота **Баумкетнера А. Б.** є, передусім, фундаментальним дослідженням у галузі фізики колоїдних систем та молекулярної біофізики. Практичне значення отриманих результатів може бути наступним. Результати роботи дозволяють формулювати рекомендації щодо умов створення штучних амілоїдних фібрил для дизайну нанопристроїв, яким, в протилежність вуглецевим наноматеріалам, притаманна біосумісність. Але найбільш перспективним повинні стати рекомендації для розуміння молекулярних механізмів виникнення хвороби Альцгеймера та інших подібних неврологічних розладів і встановлення повної картини цих захворювань.

Необхідно відзначити, що достовірність отриманих даних та наукова обґрунтованість висновків дисертаційної роботи базуються на обробці значного обсягу даних літератури, побудові моделей на основі чітких фізичних принципів, застосуванні новітніх даних щодо структури досліджуваних об'єктів, доброму узгодженні результатів з даними, що були отримані іншими дослідниками. Слід додати, що автор добре розуміє існування обмежень щодо засобів отримання результатів при вивченні різних за складом систем. Тому в кожному конкретному випадку детально оцінюються можливі похибки у значеннях отриманих параметрів, причина їх появи та існування кореляцій, які впливають з результатів розрахунків.

Дисертацію виконано відповідно до плану науково-дослідної роботи Інституту фізики конденсованих систем НАН України за сімома держбюджетними темами НАН України і чотирма етапами програмно-цільової та конкурсної тематики НАН України, повний перелік яких наведено у вступі до дисертації та в авторефераті.

Дисертація **Баумкетнера А. Б.** складається із вступу, шести розділів, висновків, переліку використаних джерел та додатка, в якому наведено публікації здобувача. Дисертаційний матеріал вичерпно ілюстровано рисунками та таблицями, перелік використаних літературних джерел дозволяє повністю зорієнтуватися у проблемі досліджень.

Вступ містить всі необхідні пункти щодо оформлення дисертацій.

Розділ 1 є оглядом літератури за основними проблемами, що вирішуються в дисертації. Розглянуто дані моделювання колективної поведінки білка лізоциму і особливу увагу приділено утворенню білкових кластерів. Наведено перелік та опис сучасних поглядів щодо ролі шаперонів у згортання білків і проблем, що виникають у експериментальних і теоретичних підходах для з'ясування цієї ролі. При аналізі літературних даних процесу агрегації білків акцент робиться на моделях з атомним наближенням. Проаналізовано відомі підходи для дослідження моторного білка міозину на атомному рівні. Висвітлено теоретичні методи вивчення реакції агрегації на прикладі згортання пептиду, пов'язаного з хворобою Альцгеймера, та розглянуто проблеми утворення амілоїдних фібрил. Але слід зауважити, що, на мою думку, огляд не є надто інформативним. В кінці розділу немає висновків, які б пояснювали постановку завдань, що вирішувалися автором при виконанні досліджень. Фрази «Існує багато аспектів згортання та агрегації білків, які досі нез'ясовані. Для досягнення помітного прогресу потрібні нові теоретичні моделі та методи», як мені здається, недостатньо для такої різноманітної за тематикою дисертації.

У **розділі 2** наведено результати дослідження колективних властивостей білків. Виведено новий потенціал взаємодії між молекулами білка лізоциму у водному розчині. Доведено, що несферична модель лізоциму краще підходить для правильного відтворення експериментально спостережуваних властивостей фазового розшарування рідина-рідина. Запропоновано новий тип потенціалу для опису формування кластерів – різноманітних мультимерів, які утворюються

внаслідок самоасоціації та перебувають у рівновазі з мономерами. За допомогою комп'ютерного моделювання показано, що такий тип потенціалів сприяє утворенню кластерів у розчинах білків. Проведено детальний аналіз структури та термодинамічних параметрів нового типу кластерів і показано, що такі кластери мають ентропійний механізм утворення при низьких густинах. При високих густинах кластери переходять у компактний стан і характеризуються ентальпійним механізмом стабілізації. Таким чином, вперше показано, що ефективний потенціал із локальним мінімумом утворює рівноважні кластери, та пояснено статистику і причини виникнення таких кластерів.

У **розділі 3** представлено результати дослідження керованих процесів згортання білків, що відбуваються за участю шаперонів. Методом молекулярної динаміки вивчено роль просторового обмеження в реакції згортання на прикладі модельного білка типу α/β сандвіч. Термодинаміка та кінетика згортання вивчалися в широкому діапазоні температур та радіуса комірки шаперону. Було встановлено, що просторове обмеження підвищує температуру колапсу білка внаслідок втрати ентропії розгорнутого стану. Автором спостерігалися як прискорення, так і сповільнення згортання, в залежності від встановленої температури. Вперше показано, що вплив обмежуючої комірки на кінетику згортання білка залежить від висоти та кількості бар'єрів – мінімумів та максимумів – на поверхні вільної енергії.

При дослідженні активної ролі комірки шаперону в процесі згортання білків встановлено, що в умовах помірно притягальної стінки згортання може протікати на порядок швидше. Виявлено, що прискорення досягається завдяки появі нового проміжного стану з низькою енергією, в якому білок зв'язаний з коміркою. Таким чином, за результатами моделювання та їх аналізу запропоновано новий механізм прискорення реакції згортання в комірках шаперону із притягальними стінками, який базується на створенні проміжного стану.

У **розділі 4** представлено результати дослідження агрегації білків за допомогою запропонованої автором нової моделі RAPID (Reduced Atomic Pair-Interaction Design) для моделювання пептидів та їх комплексів. В розділі надано детальний опис моделі та проведено її тестування на модельних об'єктах – поліаланінах різних розмірів. Встановлено мінімальний набір потенціалів, що приводить до якісно правильних результатів у порівнянні з даними для моделі з явним розчинником. Автором також показано, що модель вірно відтворює експериментально зафіксовану тенденцію поліаланінів збиратися в β -листи. Тому запропонована модель може бути використана для успішного моделювання згортання та агрегації невеликих за розміром пептидів на атомному рівні. Таким чином, автором впроваджено нову і єдину на теперішній час модель для моделювання агрегації білків, яка адекватно описує різні аспекти агрегації поліаланінових ланцюгів. Ця модель в поєднанні з комп'ютерним моделюванням була використана для дослідження згортання та агрегації аланінових поліпептидів у електричному полі різної напруженості,

тобто автором вперше запропоновано використання електричного поля з метою контролю утворення амілоїдних фібрил.

У **розділі 5** на підставі результатів молекулярного моделювання проведено дослідження мікроскопічних деталей ключового етапу у функціональному циклі моторного білка міозину – стрибка відновлення, протягом якого пасивна конформація змінюється на активну, що має здатність генерувати силу. За даними моделювання ($2\mu\text{s}$ сукупного часу) обґрунтовано, що стрибок відновлення складається з двох етапів, розділених часовим інтервалом. Детально проаналізовані структурні особливості кожного з етапів та роль структурних елементів головки міозину у формуванні низки конформацій, які відповідають різним функціональним станам міозину. Автором розглянуто декілька можливих структурних моделей для встановлення саме тієї моделі, яка – в найпростішому варіанті – тим не менш відтворює основний функціональний мотив міозину. Модельна система набагато менша за повний білок, але встановлений з її використанням механізм функціонування головки міозину добре узгоджується з наявними структурними та мутаційними дослідженнями і демонструє функціонально вірний структурний перехід.

У **розділі 6** представлено результати досліджень амілоїдних фібрил. Автором розглянуто пептид повного розміру $A\beta_{40}$ з можливою мутацією, яка викликає хворобу Альцгеймера і укорочений фрагмент $A\beta_{11-25}$. Амілоїдні фібрили досліджено в атомному наближенні з явним урахуванням розчинника. При моделюванні адсорбції мономерного поліпептиду на край існуючої фібрили отримано структури перехідного стану цього процесу. Конформаційні стани, спостережувані при моделюванні фрагментів $A\beta$, використано для обрахунку висоти бар'єру вільної енергії процесу адсорбції. Подібні розрахунки проведено для фрагмента з мутацією, яка відповідає вродженій хворобі Альцгеймера. Аналіз результатів моделювання дозволив автору порівняти бар'єри вільної енергії мутованої і «дикої» форми пептиду та зробити висновок про більш стрімкий процес агрегації мутованої форми, що узгоджується з експериментальними спостереженнями. Таким чином, запропоновано новий механізм впливу мутації E22Q на агрегацію $A\beta$ пептиду, який добре узгоджується з експериментом.

Автором наведено результати дослідження структури укороченого фрагменту фібрили $A\beta_{11-25}$. Зсув β -ниток при формуванні β -листа (регістр β -листа) для таких фібрил змінюється зі зміною рН середовища. Для пояснення на молекулярному рівні існування такої залежності було побудовано декілька структурних моделей фібрил і досліджено їхню поведінку методом молекулярної динаміки з явним урахуванням розчинника при низьких та нейтральних значеннях рН. Моделі, що показали найнижчу вільну енергію, обрано як зразки структури реальної фібрили. Показано, що регістр таких моделей збігається з експериментальними даними. В нейтральному середовищі основним внеском у різницю вільної енергії між фібрилами з двома регістрами є електростатична взаємодія. Тобто, автором вперше пояснено мікроскопічні

причини зміни регістру β -листів зі зміною рН у фібрилах фрагменту 11-25 пептиду А β .

На підставі результатів проведених досліджень автором сформульовано загальні висновки. Вони викладені у дещо нетрадиційній формі, але в повній мірі відображають обсяг виконаних досліджень. Проте, на мій погляд, заключні висновки сформульовані гірше, ніж це зроблено автором при викладенні пунктів «Наукова новизна» і «Практичне значення» з вступу до дисертації та автореферату. У заключних висновках не підкреслено оригінальність отриманих результатів, тобто не зроблено наголосу на те, що всі результати були отримані автором вперше.

Основний зміст дисертації Баумкетнера А. Б. викладено у 34 наукових публікаціях, зокрема, у 23 статтях у провідних наукових виданнях, з яких більшість опубліковано у визнаних фахових міжнародних журналах, таких як Accounts of Chemical Research (1 стаття, impact-фактор 20.268), J. Am. Chem. Soc. (1 стаття, impact-фактор 13.858), Proc. Natl. Acad. Sci. USA. (2 статті, impact-фактор 9.661), Journal of Molecular Biology (5 статей, impact-фактор 4.632), Biophys. J. (1 стаття, impact-фактор 3.656), J. Phys. Chem. B. (1 стаття, impact-фактор 3.177), Protein Sci. (3 статті, impact-фактор 2.523), Proteins Struct. Funct. Bioinf. (2 статті, impact-фактор 2.289), Phys. Rev. E. (1 стаття, impact-фактор 2.288), Journal of Chemical Physics (3 статті, impact-фактор 1.767), Condens. Matter Phys (2 статті, impact-фактор 0.882).

До опублікованих праць відносяться матеріали 11 тез доповідей на українських та міжнародних наукових конференціях, які додатково відображають наукові результати дисертації та є свідченням апробації роботи. Для всіх публікацій наведено особистий внесок здобувача. Зміст автореферату дисертації повністю відповідає основним положенням дисертаційної роботи.

Дисертаційна робота **Баумкетнера А. Б.** є завершеним науковим дослідженням, в якому наведено достатні за обсягом та науковою цінністю результати, виконано їх всебічний аналіз. В той же час рецензування за змістом дисертаційної роботи та автореферату поставило деякі питання і зауваження.

Запитання.

1. Стор. 85-86, аналіз залежностей, наведених на Рис.2.10: «Рис. 2.10, що показує частку мономерів, як функцію температури та густини для різних моделей, підтверджує цю гіпотезу. Різні символи на цьому малюнку представляють різні системи, червоні лінії відповідають високій температурі 0.62, а чорні лінії - низькій температурі 0.21.» Які саме ці дві температури?
2. Зріст ентропії при формуванні кластерів пов'язано зі збільшенням ступенів свободи і зростом можливості для "маневрування" частинок в складі кластерів чи з іншими причинами?
3. Стор. 95, підпис до Рис.3.3: «Вказано три важливі температури: колапсу T_c , згортання T_f , та мінімальна часу згортання T_m .». Далі за текстом T_m – «мінімальна температура згортання» або «проміжна температура T_m , де білок згортається швидше, ніж при будь-якій іншій температурі» (стор.96)

- або просто «мінімальна температура» (стор.96) або навіть «мінімальна температура згортання часу» (стор.98). Незрозуміло, що таке T_m – це мінімальна температура згортання чи температура для випадку, коли білок згортається за найкоротший час, чи щось інше?
4. Стор.119. Не зовсім зрозумілий – для мене – висновок: «Для притягальної стінки, комірка може відігравати активну роль, безпосередньо впливаючи на процес згортання.» Що тут більш важливе: комірка взагалі чи її притягальна стінка і що в даному випадку є «притягальна стінка»?
 5. Стор. 121: «...значення напруженості поля, необхідне для дисоціації амілоїдів, наближається до характерної межі, що притаманна біологічним системам.» Які саме ці межі?
 6. При аналізі Рис. 4.4 на стор.131: «...найбільш помітна відмінність спостерігається для малих r , де глибина першого мінімуму змінюється на близько 1 кДж/моль між ітераціями або біля 20%.» Є якийсь фізичний сенс у суттєво різній ширині цих мінімумів?
 7. Стор. 241-242: «Тому ми бачимо, що вплив E22 на структурні властивості фрагмента СНС досить добре описує фізику, яка лежить в основі підвищення рівня осідання в пептиді...» та стор. 259: «...ці стикування не можуть забезпечити фізично розумних зміщень β листів,...». Яку «фізику» Ви маєте на увазі?

Загальні зауваження

1. Стилїстика. Багато невдалих виразів. Наприклад, (стор.104): «Очевидно, що білок більше не відвідує конформації з великим радіусом в обмеженому середовищі». Мабуть, краще: «Очевидно, що білок більше не набуває конформацій ...». (стор.159): «Ми дійсно бачимо збільшення кількості спіралей з конформаціями, вирівняними вздовж поля та виснаженням кількості у конформаціях, вирівняних проти нього.»; (стор.255): «Оскільки димер β -нитки не може пояснити, чому реєстр змінюється»; стор.284: «...витрати на сольватацію шматка гідрофобної поверхні» і таке інше.
2. Пунктуація. Катастрофічне становище з розділовими знаками, особливо з комами. Наприклад, у реченні «Енергії отримані за умов відсутності комірки для вихідної моделі показані синім кольором тоді як дані для моделі з пониженим рівнем фрустрації – оранжевим» (стор. 104) відсутні всі необхідні коми (всього їх повинно бути 3). Це дуже заважає розумінню результатів.

Слід зазначити, що наведені зауваження не є принциповими і не зменшують загальної якості дисертаційної роботи.

Дисертаційна робота **Баумкетнера Андрія Богдановича** «Нові аспекти згортання та агрегації білків: теорія та комп'ютерне моделювання» виконана за спеціальністю 01.04.24 – фізика колоїдних систем. Уважно проаналізувавши текст дисертації, констатую, що дисертація відповідає усім кваліфікаційним вимогам, які висуваються до такого типу робіт, а саме – це закінчене наукове дослідження на актуальну тему, у якому вирішено низку принципово нових задач.

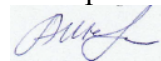
За своєю спрямованістю та змістом дисертація повністю і адекватно відповідає обраній спеціальності 01.04.24 – фізика колоїдних систем.

Всі результати дисертації мають важливе фундаментальне та прикладне значення для розуміння колективних властивостей компонентів колоїдних систем на прикладі біополімерів – процесів утворення кластерів, згортання та агрегації білків. Як найбільш вагомий внесок до вирішення зазначеної наукової проблеми варто вказати ідеологічну і методологічну складові дисертації, а саме: розроблено, обґрунтовано та систематизовано теоретичні і обчислювальні методи для виконання детального аналізу колективних властивостей білків.

Результати наукових досліджень, за якими здобувач захистив кандидатську дисертацію, на захист докторської дисертації не винесено.

Вважаю, що за актуальністю теми, науковою новизною результатів, об'ємом виконаних досліджень, обґрунтованістю висновків, науково-практичною значимістю дисертаційна робота **Баумкетнера Андрія Богдановича** відповідає вимогам до докторських дисертацій, щодо "Порядку присудження наукових ступенів", затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24 липня 2013 року № 567, а її автор **Баумкетнер Андрій Богданович** заслуговує присудження наукового ступеня доктора фізико-математичних наук за спеціальністю 01.04.24 – фізика колоїдних систем.

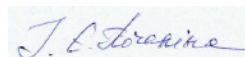
Офіційний опонент доктор фіз.-мат. наук, с.н.с.,
завідувач відділом біологічної фізики
Інституту радіофізики та електроніки ім. О.Я. Усикова НАН України



Г.В.Шестопалова

Підпис доктора фіз.-мат. наук, с.н.с., завідувача відділом біологічної фізики
Інституту радіофізики та електроніки ім. О.Я. Усикова НАН України Г.В.Шестопалової
засвідчую:

Вчений секретар Інституту радіофізики та електроніки
ім. О.Я. Усикова НАН України,
кандидат фізико-математичних наук



І.Є.Почаніна

20 квітня 2018 р.