

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель директора по научной работе
НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ



д.б.н. С.В. Саранцева

« 25 » декабря 2024 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

федерального государственного бюджетного учреждения «Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова Национального исследовательского центра «Курчатовский институт» на диссертацию **Лебеденко Ольги Олеговны «Расчёты измеряемых параметров ЯМР на основе данных МД моделирования биомолекулярных систем: новые методы и приложения»**, представленную на соискание учёной степени кандидата физико-математических наук по специальности 1.3.8. – «Физика конденсированного состояния».

Актуальность темы выполненной работы

Исследование динамики и стабильности белков и макромолекулярных комплексов, в частности, внутренне неупорядоченных белков или их фрагментов, чрезвычайно важно в прогнозировании свойств, таких как протеолитическая деградация, возможность посттрансляционной модификации, склонность к образованию амилоидных фибрилл. Современные методы компьютерного моделирования, в основном, нацелены на предсказание свойств глобулярных белков и довольно неплохо справляются с этой задачей, поскольку основной массив экспериментальных структурных данных относится именно к этому классу белков. Для использования в методе молекулярной динамики (МД) силовые поля создавались, оптимизировались и тестировались для структурированных глобулярных белков. Для такого рода систем накоплен большой опыт исследований, позволяющих оценивать сильные и слабые стороны существующих силовых полей и вносить соответствующие коррективы при их обновлении.

Представленная диссертационная работа Лебеденко О.О. посвящена компьютерному моделированию белков методом молекулярной динамики, разработке и применению различных схем МД моделирования, оптимизации алгоритмов МД для оценки параметров (таких как химические сдвиги, скорости

33-06-1289 от 27.12.2024

спиновой релаксации, коэффициенты диффузии), измеряемых в экспериментах ядерного магнитного резонанса (ЯМР).

Основное внимание уделено внутренне неупорядоченным белкам. В работе предложены новые и усовершенствованные алгоритмы для расчёта параметров ЯМР на основе данных МД моделирования. Также в диссертации проводится сравнение расчётных параметров с результатами экспериментальных измерений. Такой анализ позволяет надёжным и достоверным образом осуществлять тестирование рассматриваемых моделей МД. В свою очередь, успешная валидация даёт возможность для использования модели в качестве уникального источника информации о динамике неупорядоченных белков и, в более широком смысле, о динамике белковых молекул в целом.

Таким образом, развиваемые в диссертации Лебедеко О.О. новые методы и подходы в МД моделировании биомолекул, сравнительный анализ расчётов с экспериментом являются необходимыми и актуальными, поскольку позволяют получить информацию, недоступную другими экспериментальными методами и востребованную в биофизических и биомедицинских исследованиях.

Структура и основное содержание диссертационной работы

Диссертация состоит из введения, трёх глав, заключения, списка сокращений, раздела благодарностей и списка литературы. Работа изложена на 209 страницах (английский перевод – 174 стр.) и включает 37 рисунков и 9 таблиц.

Во **введении** дан общий обзор современного состояния исследований структуры и динамики белков, описаны основные методы, обоснованы актуальность, новизна и практическая ценность диссертации, сформулированы цели и задачи, основные положения, выносимые на защиту, приводится информация о личном вкладе автора в проделанную работу, о достоверности и апробации результатов на конференциях, а также о публикациях по теме работы.

В **первой главе** диссертации рассматривается вопрос о применимости данных диффузионных методов ЯМР для валидации МД моделей неупорядоченных белков. В качестве исследуемой модели выбран неупорядоченный N-концевой фрагмент гистона H4 (аминокислотные остатки 1-25). Расчёт коэффициента трансляционной диффузии исследуемой молекулы из данных МД моделирования представляет собой нетривиальную задачу. Результат расчёта зависит от размера ячейки моделирования, выбранного алгоритма термостатирования и других параметров моделирования. С учетом

существующих сложностей в работе сформулирован протокол для вычисления коэффициента диффузии белка напрямую из данных МД моделирования без использования обобщенных гидродинамических моделей, часто возникающих в расчетах коэффициента диффузии упорядоченных белков. Протестирован ряд моделей молекул воды и осуществлено моделирование в ячейках различного объема. Продемонстрировано, что использование диффузионных данных ЯМР совместно с результатами МД моделирования позволяет получить представление о компактности конформационного ансамбля неупорядоченного белка.

Во **второй главе** исследуется конформационная динамика N-концевого участка хвоста гистона H4 в составе нуклеосомы. Конформационный ансамбль N-концевого участка хвоста гистона H4 сконструирован на основе экспериментальных данных усиления парамагнитной релаксации (PRE) для образца нуклеосомы с введенной нитроксильной парамагнитной меткой. Для расчета значений PRE из данных МД моделирования сформулирован протокол, опирающийся на строгие теоретические выражения. Продемонстрировано, что длинные МД траектории, записанные с использованием силовых полей последнего поколения, позволяют более качественным образом воспроизвести экспериментальные значения скоростей парамагнитной спиновой релаксации в неупорядоченных белках. Полученные данные говорят о преимущественной локализации гистоновых хвостов вблизи поверхности нуклеосомной частицы, что необходимо учитывать при описании взаимодействия гистоновых хвостов с ассоциированными белками и регулируемыми факторами.

В **третьей главе** исследуется вопрос, каким образом упаковка молекул белка в кристалле влияет на динамику боковых цепей ароматических аминокислотных остатков. Проведено МД моделирование трёх кристаллических форм убиквитина и охарактеризована динамика ароматических колец остатков фенилаланина в трех формах кристалла. Осуществлено сравнение результатов МД моделирования с данными твердотельной спектроскопии ЯМР. Показаны различия в динамике ароматических колец в зависимости от локализации в молекуле белка и проведен анализ факторов, потенциально влияющих на обнаруженные отличия.

В **заключении** сформулированы основные результаты работы.

В целом структура диссертации отличается ясной логикой, материал хорошо структурирован, его изложение хорошо соотносится с целями, задачами и защищаемыми положениями. Выводы полностью соответствуют проведенному исследованию.

Научная новизна и практическая значимость работы

Все представленные в работе научные результаты, а также положения, вынесенные на защиту, являются актуальными и новыми.

Представлена схема для МД моделирования белковых молекул, позволяющая рассчитывать экспериментальные параметры системы, такие как коэффициенты трансляционной и вращательной диффузии. Обосновано применение параллельной записи большого количества траекторий МД с использованием кластера серверов, а также показано, что применение схемы перераспределения массы водорода не только для молекулы белка, но одновременно и для молекул воды позволяет использовать увеличенный шаг интегрирования равный 4 фс. Данный результат позволит в будущем существенным образом ускорить вычисления при решении аналогичных задач. В работе сравниваются различные модели молекул воды, TIP4P-Ew, TIP4P-D, OPC и делаются выводы о применимости перечисленных моделей для исследования диффузионных параметров неупорядоченных пептидов. При этом впервые для валидации различных МД моделей неупорядоченных белков применялся строгий расчет диффузионных коэффициентов напрямую из МД траекторий без использования обобщенных эмпирических данных о гидродинамике белковых молекул. Показано, что предложенный подход позволяет более точно оценить применимость конкретных моделей молекул воды для моделирования неупорядоченных белков, поскольку существующие на сегодняшний день подходы разрабатывались в основном для работы с упорядоченными белками и не учитывают сегментальной динамики, в значительной мере, определяющей диффузионные свойства неупорядоченной белковой молекулы.

Кроме этого, автором предложена схема анализа данных усиления парамагнитной релаксации в хвостах гистонов нуклеосомной частицы, основанная на прямом расчете скоростей PRE из данных молекулярной динамики. При этом учитывается не только изменение ориентаций векторов между парамагнитным спином и релаксирующим ядром, но и модуляция межспиновых расстояний. В результате сравнения экспериментальных данных о парамагнитной релаксации с расчетными значениями были проверены модели МД нуклеосомы. Показано, что хвост гистона H4 преимущественно локализован вблизи нуклеосомной ДНК, что затрудняет его взаимодействие с гистон-модифицирующими энзимами и другими хроматин-ассоциированными белками. Кроме того, в работе делается вывод о необходимости записи исключительно длинных и, судя по всему, технически недоступных на сегодняшний день, МД траекторий для улучшения сходимости моделирования

и лучшего покрытия конформационного фазового пространства моделируемой нуклеосомной частицы.

МД моделирование используется для дополнения и интерпретации данных ЯМР о динамике остатков фенилаланина в различных формах кристаллов убиквитина. Делаются выводы о влиянии кристаллических контактов, доступного объема и конформации боковой цепи на характерные времена переворотов ароматических колец.

Достоверность и апробация работы

Корректность поставленных в диссертации вопросов и задач, логичность и обоснованность аргументации и выводов, сделанных в работе, строгость применяемого математического аппарата, а также соответствие экспериментальным данным, не позволяют усомниться в достоверности и обоснованности результатов данного диссертационного исследования.

Результаты работы были представлены на российских и международных конференциях:

1. «65-th Biophysical Society Annual Meeting», онлайн, 22 февраля – 26 февраля 2021.

2. Международная конференция «Современное развитие методов магнитного резонанса 2021», Казань, Россия, 1 ноября – 5 ноября 2021.

3. VI ежегодная конференция ИТБМ СПбГУ «Актуальные проблемы трансляционной биомедицины – 2022», Санкт-Петербург, Россия, 25 июля – 26 июля 2022 г.

4. «Chinese Biophysics Congress 2024», Ланьчжоу, Китай, 25 июля – 28 июля 2024.

Кроме того, основные результаты по теме диссертации изложены в 3 печатных работах в международных журналах, индексируемых в базах данных Scopus и Web of Science:

1. Using NMR diffusion data to validate MD models of disordered proteins: Test case of N-terminal tail of histone H4 / O. O. Lebedenko et al. // *Biophysical Journal*. – 2024. – Jan. – Vol. 123, no. 1. – P. 80–100.
2. Conformational and Interaction Landscape of Histone H4 Tails in Nucleosomes Probed by Paramagnetic NMR Spectroscopy / W. Sun et al. // *Journal of the American Chemical Society*. – 2023. – Sept. – Vol. 145, no. 46. – P. 25478–25485.

3. Aromatic ring flips in differently packed ubiquitin protein crystals from MAS NMR and MD / D. F. Gauto et al. // Journal of Structural Biology: X. – 2023. – Dec. – Vol. 7. – P. 1–12.

Публикации по теме диссертационной работы полностью отражают её содержание.

Недостатки диссертации и замечания

Диссертационная работа Лебеденко О.О. выполнена на высоком профессиональном уровне и лишена серьезных недостатков, а высказанные ниже замечания имеют в основном уточняющий характер.

В главе 1 среди прочего сравниваются экспериментальные и расчетные скорости релаксации ядер ^{15}N амидных атомов азота в основной цепи пептида N-H4 (Рисунок 1.6) и делаются выводы о компактности белковой цепи. При этом заметно систематическое отклонение расчетного профиля скоростей релаксации от экспериментального в С-концевой области пептида (остатки 15-25), в то время как для N-концевого участка наблюдается лучшее согласие эксперимента с расчетом. Это может указывать на недостаточно точное описание динамики заряженного участка пептида в МД моделировании. Данное обстоятельство вызывает интерес и, к сожалению, не получило подробного обсуждения в работе.

Необходимо отметить не вполне корректное использование понятия «валидация» в тексте диссертации. Процесс валидации описан в некоторых нормативных документах, например, ASTM E1355 и др. На мой взгляд, валидация - это процесс определения степени соответствия расчетной модели реальному физическому объекту в рамках области планируемого использования данной модели. Результат валидации позволяет достичь **уверенности** в корректности численной модели. Валидация включает несколько аспектов, только одним из которых является сравнение результатов моделирования с экспериментальными данными. Такое сравнение и является основным в диссертации. Однако, такое различие в толковании этого термина не вводит в заблуждение, и из контекста понятно о чем идет речь в тексте диссертации — тестировании.

Также не определено, в каком смысле используется термин «компактность» 3-х мерной структуры, и количественная оценка этого параметра. Построенное в работе распределение по гидродинамическому радиусу могло бы служить основой для определения компактности.

Полагаем, что количество положений, выносимых на защиту, избыточно.

В Заключении диссертации практически отсутствуют выводы по содержанию Главы 3.

Кроме этого, нужно отметить, что работа не лишена опечаток и оформительских ошибок. Так, например:

- на стр. 46 пропущен пробел: «... пептид N-H4неупорядочен»;
 - на стр. 165 подпись к Рис.3.8 на английском языке;
- и еще ряд аналогичных опечаток.

Высказанные замечания не являются принципиальными и не снижают общего положительного впечатления от диссертации. А достоверность результатов этой работы, несомненно, подтверждаются тем, что они были опубликованы в международных журналах с признанной репутацией и представлены на профильных Российских и международных конференциях.

Результаты, полученные в данном диссертационном исследовании, имеют несомненную научную значимость и могут быть рекомендованы для использования в исследовательской деятельности ряда научных центров России: Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Казанского федерального университета, Санкт-Петербургского государственного университета, Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого и других ведущих научных коллективов, занимающихся структурной биологией и молекулярным моделированием биологических макромолекул.

Заключение

Диссертационная работа Лебедеико О.О. является научно-квалификационной работой, выполненной на высоком профессиональном уровне, в которой на основании проведенных автором исследований решена задача расчета диффузионных параметров и скоростей парамагнитной релаксации на основе новой высокоэффективной схемы МД моделирования и показана ее применимость для разупорядоченных белков.

Диссертационная работа Лебедеико Ольги Олеговны «Расчёты измеряемых параметров ЯМР на основе данных МД моделирования биомолекулярных систем: новые методы и приложения» является завершённым научным исследованием, выполненным на высоком профессиональном уровне. По актуальности темы, научной новизне исследования и полученным результатам, обоснованности и достоверности научных результатов, теоретической и практической значимости отвечает требованиям, установленным Приказом СПбГУ от 19.11.2021 №11181/1 «О порядке присуждения учёных степеней в Санкт-Петербургском государственном

университете», предъявляемым к кандидатским диссертациям, а её автор заслуживает присуждения учёной степени кандидата физико-математических наук по специальности 1.3.8. – «Физика конденсированного состояния».

Отзыв подготовлен кандидатом физико-математических наук (01.04.01 - Техника физического эксперимента, физика приборов, автоматизация физических исследований), Ученым секретарем отделения молекулярной и радиационной биофизики НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ Шабалиным К.А.

Отзыв обсуждён и утвержден на Учёном совете Отделения молекулярной и радиационной биофизики НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ 28 ноября 2024 г. (протокол № 153 от 28 ноября 2024 г.).

Отзыв подготовил:

Учёный секретарь Отделения
молекулярной и радиационной
биофизики
НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ
к.ф.-м.н.

К.А. Шабалин
shabalin_ka@pmpi.nrcki.ru

Руководитель Отделения молекулярной
и радиационной биофизики
НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ,
к.ф.-м.н.

А.Л. Коневега
konevega_al@pmpi.nrcki.ru

Контакты ведущей организации:

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова Национального исследовательского центра «Курчатовский институт»

188300, Ленинградская область, г. Гатчина, мкр. Орлова роща, д. 1.

Телефон: +7(81371) 460-25, E-mail: dir@pmpi.nrcki.ru.