COMPUTATIONAL CHARACTERIZATION OF COOPERATIVE DYNAMICS AND LARGE-SCALE CONFORMATIONAL TRANSITIONS IN BIOMOLECULES AND THEIR ASSEMBLIES

RAJAT PUNIA

DEPARTMENT OF CHEMICAL ENGINEERING
INDIAN INSTITUTE OF TECHNOLOGY DELHI
APRIL 2025

Computational Characterization of Cooperative Dynamics and Large-Scale Conformational Transitions in Biomolecules and their Assemblies

by

Rajat Punia

Department of Chemical Engineering

submitted in fulfillment of the requirements of the degree of

Doctor of Philosophy

to the

Indian Institute of Technology Delhi

April 29, 2025

Dedicated to my wife Shreya for her unwavering support throughout this academic journey

Certificate

This is to certify that the thesis entitled **"Computational Characterization of Cooperative Dynamics and Large-Scale Conformational Transitions in Biomolecules and their Assemblies"**, submitted by **Rajat Punia** to the Indian Institute of Technology Delhi, for the award of the degree of **Doctor of Philosophy**, is a record of the original, bona fide research work carried out by him under my supervision and guidance. The thesis has reached the standards fulfilling the requirements of the regulations related to the award of the degree.

The results contained in this thesis have not been submitted in part or in full to any other University or Institute for the award of any degree or diploma to the best of our knowledge.

Date:

Prof. Gaurav Goel
Department of Chemical Engineering,
Indian Institute of Technology Delhi
New Delhi, India

Acknowledgements

First and foremost, I would like to express my heartfelt gratitude to my supervisor, Prof. G. Goel, for granting me the opportunity to join his research group. His profound intelligence, meticulous attention to detail, and unwavering pursuit of excellence have been both inspiring and instrumental throughout my research journey. Prof. Goel's exceptional communication skills fostered an environment of open dialogue, allowing for enriching technical discussions, constructive critiques, and insightful perspectives during our weekly meetings. His continuous support and patience provided me with the freedom to explore and develop on multiple levels. I am particularly grateful for his extensive support, not only pertaining to this research project but also concerning my future endeavors. Without his professional guidance, deep knowledge, and invaluable suggestions, this thesis would not have reached its current form.

I extend my deep gratitude to my research committee members, Prof. M. Banerjee, Prof. A. S. Rathore, Prof. S. Gupta, and Prof. S. Pattnaik, for their valuable suggestions, time, and thoughtful corrections throughout the duration of my Ph.D. I would also like to thank the faculty members and office staff of the Department for their cordiality and assistance whenever needed. Special thanks to Krishna Kumar for his help with lab organization. I am truly grateful to the HPC facility at IIT Delhi for providing the computational resources essential to my research.

Additionally, I extend my sincere gratitude to my research collaborators, Prof. M. Banerjee, Prof. R. Kulsheshtra, and their research group. Their collaboration, creative discussions, and unwavering support have significantly enriched my research journey. I am deeply thankful to my lab members, Akshay, Ankit, Rit Pratik, and Julie, for their invaluable help, active discussions, and for being great friends throughout this process. My heartfelt thanks also go to Pratyasha, Abhilasha, Shivam, and Vasu, with whom I had the pleasure of engaging in stimulating scientific discussions and whose assistance has been greatly appreciated.

Lastly, I owe my deepest gratitude to my family, whose unwavering support, boundless patience, and belief in me have been the foundation of my perseverance.

Rajat Punia

Abstract

Cooperative conformational transitions in biomolecules are crucial for several biological processes, including ATP catalysis, membrane transport, viral infectivity, and oxygen transport by hemoglobin. These transitions often involve collective, large-scale structural rearrangements integral to biomolecular function and regulation. Characterizing these transitions poses significant challenges due to the vast timescales involved, spanning milliseconds to seconds, which exceed the capabilities of traditional molecular dynamics (MD) simulations limited to the nanosecond to microsecond range. This thesis introduces 'linear response driven molecular dynamics,' a novel computational approach designed to efficiently and accurately characterize these transitions by leveraging the intrinsic dynamics of biomolecules. Our approach fits within a broader class of methods that use coarse-grained dynamics in the subspace of internal degrees of freedom, with normal mode analysis (NMA) being one of the most prominent techniques in this category.

While such methods have shown utility in applications like flexible docking, structural refinement to fit cryo-EM density maps, and predicting conformational pathways from apo to holo states, they have notable limitations. First, many existing methods rely heavily on experimental data to guide conformational sampling. In the absence of this data, they face computational challenges, where sampling time scales exponentially with the number of degrees of freedom (or modes) considered. Additionally, these methods often involve fixed displacements along selected modes without considering the thermodynamic feasibility of the resulting conformational change pathway or the metastability of intermediate states. Most of these approaches are limited in their applicability to small, globular proteins; the computational complexity becomes prohibitive for larger protein assemblies, such as viral capsids, necessitating significant methodological developments for broader applications. While existing methods account for the elastic properties of selected modes, they often overlook frictional damping, which is particularly limiting for biomolecules like lipid bilayers, where frictional effects play a crucial role in governing conformational transitions.

To address these limitations, we developed a multi-step, linear response-driven molecular dynamics simulation protocol that samples the transition pathways and

intermediate states associated with large-scale conformational changes. This approach employs the computationally efficient elastic network model (ENM) to represent the intrinsic vibrations of biomolecules and linear response theory (LRT) to identify a small, relevant subset of modes. Instead of fixed conformational displacements, structural changes along these selected modes are dynamically accelerated using excited normal modes molecular dynamics (MDeNM) simulations. This protocol includes a systematic approach for selecting excitation velocity vectors and incorporates frictional damping where necessary, yielding a computationally efficient and physically accurate method to explore complex conformational transitions in biomolecular systems.

The first objective of this thesis addresses the challenge of delineating protein conformational transition pathways upon ligand binding. Employing an elastic network model description and LRT, we identified slow normal modes of protein vibrations that correspond with conformational shifts from the apo to holo states. Conformational along these modes were dynamically updated using MDeNM simulations, providing a series of intermediate states. Herein, the MDeNM excitation velocity was optimized on-the-fly on the basis of its coupling to protein dynamics and ligand–protein interactions. Thus, a determined set of structures was validated against crystallographic and simulation data on four protein-ligand systems, namely, adenylate kinase–di(adenosine-5′)pentaphosphate, ribose binding protein−β-d-ribopyranose, DNA β-glucosyltransferase–uridine-diphosphate, and G-protein α subunit–guanosine -5′-triphosphate, which present important differences in protein conformational heterogeneity, ligand binding mechanism, viz. induced-fit or conformational selection, extent, and nonlinearity in protein conformational changes upon ligand binding, and presence of allosteric effects.

In the second objective, we explored the native-state dynamics of the Flock House virus (FHV) capsid and its role in the release mechanism of cell-penetrating γ-peptides, a crucial process for viral infectivity. Through MD simulations and NMA, we found that γ-peptide release is intrinsically linked to the capsid's vibrational

dynamics. MDeNM simulations revealed large-scale structural rearrangements, enabling a detailed mapping of the free energy landscape and elucidating the molecular-level mechanisms of peptide release. We analyzed the intrinsic motions of a pentameric sub-structure of the FHV capsid, accounting for the influence of the surrounding capsid on the substructure's dynamics. We observed that a single normal mode of native state dynamics was dominantly associated with the initial direction of γ-peptide release. Sampling along this mode using MDeNM simulations showed a large-scale structural rearrangement in the capsid and an orientation flip of the γ_A peptide during release. These findings were used to identify relevant collective variables (CVs) and to map the free energy landscape using bias-exchange metadynamics, therby elucidating the molecular-level mechanism of peptide release.

In third objective, we investigated lipid membrane remodeling, which is vital for numerous cellular processes. Slow dynamics and the lack of knowledge of reaction coordinates (RCs) for biasing methods pose a challenge for all-atom simulations to study conformational changes in lipid bilayers. We characterized bilayer vibrational dynamics by mapping system dynamics onto Langevin dynamics in normal mode space, derived from an ENM of the lipid-water Hamiltonian. All-atom MD simulations were used to determine model parameters, and Langevin dynamics predictions for bilayer structural, mechanical, and dynamic properties are validated against MD simulations and experiments. This method elucidated generic reaction coordinates (RCs) for pore formation in DMPC and DPPC bilayers. Enhanced sampling along these RCs, using path-metadynamics and umbrella sampling, revealed the thermodynamics of pore formation and highlighted the roles of lipid solvation and packing.

The importance of such precise characterizations of protein conformational transitions in drug discovery is exemplified in the fourth objective, which focused on the investigation of differential transitions in the hypoxia-inducible factor 2 (HIF-2) upon agonist and antagonist binding. HIF-2 is critical for cellular adaptation to low oxygen conditions and, both activation and inhibition of HIF-2 activity have significant therapeutic relevance, with potential applications in treating cancer, renal anemia, and acute kidney injury. We showed that multiple HIF-2 structures with distinct binding pocket conformations were required for docking-based ligand screening to effectively capture the plasticity of the binding domain. Using all-atom MD simulations of HIF-2 with various ligands and decoys, we identified unique

structural, dynamic, and thermodynamic changes associated with different ligand categories. We analyzed the allosteric mechanism of ligand-induced local structural and dynamic changes, as well as their global effects and corresponding time scales. Our findings demonstrate that distinct ligand-induced conformational changes can effectively distinguish agonists from antagonists, aiding in the identification of potential active compounds and minimizing false positives in virtual screening.

सार

बायोमोलेक्यूल्स में सहकारी संरचनात्मक परिवर्तन एटीपी उत्प्रेरण, झिल्ली परिवहन, वायरल संक्रमणशीलता, और हीमोग्लोबिन द्वारा ऑक्सीजन परिवहन जैसी मौलिक जैविक प्रक्रियाओं के लिए महत्वपूर्ण हैं। ये परिवर्तन अक्सर सामूहिक, बड़े पैमाने पर संरचनात्मक पुनर्व्यवस्थाओं को शामिल करते हैं जो बायोमोलेक्यूल्स के कार्य और विनियमन के लिए अनिवार्य हैं। इन परिवर्तनों का वर्णन करना महत्वपूर्ण चुनौतियाँ प्रस्तुत करता है क्योंकि ये मिलीसेकंड से सेकंड तक फैले विस्तृत समय सीमाओं में होते हैं, जो पारंपरिक मॉलिक्यूलर डायनेमिक्स (MD) सिमुलेशन की क्षमताओं से परे हैं, जो नैनोसेकंड से माइक्रोसेकंड तक सीमित हैं। यह शोध प्रबंध 'लिनियर रिस्पॉन्स ड्रिवन मॉलिक्यूलर डायनेमिक्स' नामक एक नवीन कम्प्यूटेशनल दृष्टिकोण प्रस्तुत करता है, जो बायोमोलेक्यूल्स की आंतरिक डायनेमिक्स का लाभ उठाकर इन परिवर्तनों को प्रभावी और सटीक रूप से वर्णित करने के लिए डिज़ाइन किया गया है। हमारा दृष्टिकोण उन विधियों के व्यापक वर्ग में फिट होता है जो आंतरिक स्वतंत्रता डिग्री के उपक्षेत्र में कोर्स-ग्रेन्ड डायनेमिक्स का उपयोग करती हैं, जिसमें नॉर्मल मोड एनालिसिस (NMA) इस श्रेणी में सबसे प्रमुख तकनीकों में से एक है।

लांकि ऐसी विधियों ने फ्लेक्सिबल डॉकिंग, क्रायो-ईएम घनत्व मानचित्रों में फिट होने के लिए संरचनात्मक परिशोधन, और एपो से होलो अवस्थाओं तक संरचनात्मक मार्गों की भविष्यवाणी जैसे अनुप्रयोगों में उपयोगिता दिखाई है, लेकिन उनकी उल्लेखनीय सीमाएँ हैं। पहला, कई मौजूदा विधियाँ संरचनात्मक सैम्पलिंग को मार्गदर्शन देने के लिए प्रयोगात्मक डेटा पर अत्यधिक निर्भर हैं। इस डेटा की अनुपस्थिति में, वे कम्प्यूटेशनल चुनौतियों का सामना करती हैं जो विचार किए गए स्वतंत्रता डिग्री (या मोड्स) की संख्या के साथ घातीय रूप से बढ़ती हैं। इसके अलावा, ये विधियाँ अक्सर चयनित मोड्स के साथ निश्चित विस्थापन शामिल करती हैं, बिना परिणामी संरचनात्मक परिवर्तनों की उष्मागतिकीय संभवता या मध्यवर्ती अवस्थाओं की अर्धस्थायित्व को ध्यान में लिए। इनमें से अधिकांश दृष्टिकोणों की प्रयोज्यता छोटे, गोलाकार प्रोटीनों तक सीमित है; बड़ी प्रोटीन असेंबलीज़ जैसे वायरल कैप्सिड्स के लिए कम्प्यूटेशनल जटिलता अत्यधिक हो जाती है, जो व्यापक अनुप्रयोगों के लिए महत्वपूर्ण पद्धति विकास की आवश्यकता उत्पन्न करती है। जबकि मौजूदा विधियाँ चयनित मोड्स के लोचदार गुणों को ध्यान में रखती हैं, वे अक्सर घर्षणीय डैम्पिंग को नजरअंदाज कर देती हैं, जो लिपिड बाइलेयर्स जैसे बायोमोलेक्यूल्स के लिए विशेष रूप से सीमित है, जहाँ घर्षणीय प्रभाव संरचनात्मक संक्रमणों को नियंत्रित करने में महत्वपूर्ण भूमिका निभाते हैं।

इन सीमाओं को दूर करने के लिए, हमने एक बहु-चरणीय, लिनियर रिस्पॉन्स-चालित कम्प्यूटेशनल प्रोटोकॉल विकसित किया है जो बड़े पैमाने पर संरचनात्मक परिवर्तनों से जुड़े संक्रमण मार्गों और मध्यवर्ती अवस्थाओं का नमूना लेता है। यह दृष्टिकोण बायोमोलेक्यूल्स की आंतरिक कंपन को दर्शाने के लिए कम्प्यूटेशनल रूप से कुशल इलास्टिक नेटवर्क मॉडल (ENM) का उपयोग करता है और मोड्स के एक छोटे, प्रासंगिक उपसमूह की पहचान करने के लिए लिनियर रिस्पॉन्स थ्योरी (LRT) को अपनाता है। निश्चित संरचनात्मक विस्थापनों के बजाय, चयनित मोड्स के साथ संरचनात्मक परिवर्तन उत्तेजित नॉर्मल मोड्स

मॉलिक्यूलर डायनेमिक्स (MDeNM) सिमुलेशनों का उपयोग करके गतिशील रूप से तीव्र किए जाते हैं। यह प्रोटोकॉल उत्तेजना वेग वेक्टरों के चयन के लिए एक प्रणालीगत दृष्टिकोण शामिल करता है और जहां आवश्यक हो वहां घर्षणीय डैम्पिंग को सम्मिलित करता है, जिससे बायोमोलेक्यूलर सिस्टम में जटिल संरचनात्मक संक्रमणों का पता लगाने के लिए एक कम्प्यूटेशनल रूप से कुशल और भौतिक रूप से सटीक विधि प्राप्त होती है।

इस शोध प्रबंध का पहला उद्देश्य लिगैंड बाइंडिंग के समय प्रोटीन संरचनात्मक संक्रमण मार्गों को परिभाषित करने की चुनौती को संबोधित करता है। इलास्टिक नेटवर्क मॉडल विवरण और LRT का उपयोग करके, हम प्रोटीन कंपन के धीमे नॉर्मल मोड्स की पहचान करते हैं जो एपो से होलो अवस्थाओं में संरचनात्मक परिवर्तनों के अनुरूप होते हैं। इन मोड्स के साथ संरचनाओं को MDeNM सिमुलेशनों का उपयोग करके गतिशील रूप से अपडेट किया गया, जिससे मध्यवर्ती अवस्थाओं की एक श्रृंखला प्राप्त हुई। यहां, MDeNM उत्तेजना वेग को प्रोटीन डायनेमिक्स और लिगैंड–प्रोटीन इंटरैक्शन के साथ उसके कपलिंग के आधार पर ऑन-द-फ्लाई ऑप्टिमाइज़ किया गया। इस प्रकार, संरचनाओं के एक निर्धारित सेट को चार प्रोटीन-लिगैंड सिस्टमों पर क्रिस्टलोग्राफिक और सिमुलेशन डेटा के विरुद्ध सत्यापित किया गया, अर्थात् एडेनिलेट किनेज–डाइ(एडेनोसिन-5)पेंटाफॉस्फेट, राइबोज बाइंडिंग प्रोटीन–β-D-रिबोपाइरानोज़, DNA β-ग्लूकोसिलट्रांस्फेरेज़–यूरिडीन-डाइफॉस्फेट, और G-प्रोटीन α सबयूनिट–गुआनोसिन-5-ट्राइफॉस्फेट, जो प्रोटीन संरचनात्मक विषमता, लिगैंड बाइंडिंग तंत्र जैसे प्रेरित-फिट या संरचनात्मक चयन, सीमा और लिगैंड बाइंडिंग पर प्रोटीन संरचनात्मक परिवर्तनों में गैर-रेखीयता, और एलोस्टेरिक प्रभावों की उपस्थिति में महत्वपूर्ण अंतर प्रस्तुत करते हैं।

दूसरे उद्देश्य में, हम $\mathrm{Flock\ House}$ वायरस (FHV) कैप्सिड की मूल-राज्य डायनेमिक्स और सेल-प्रवेश करने वाले γ-पेप्टाइड्स के रिलीज़ तंत्र में उसकी भूमिका का अध्ययन करते हैं, जो वायरल संक्रमणशीलता के लिए एक महत्वपूर्ण प्रक्रिया है। MD सिमुलेशन्स और NMA के माध्यम से, हमने पाया कि γ-पेप्टाइड रिलीज़ कैप्सिड की कंपन डायनेमिक्स से आंतरिक रूप से जुड़ी हुई है। MDeNM सिमुलेशन्स ने बड़े पैमाने पर संरचनात्मक पुनर्व्यवस्थाओं को उजागर किया, जिससे मुक्त ऊर्जा परिदृश्य का विस्तृत मानचित्रण संभव हुआ और पेप्टाइड रिलीज़ के आणविक-स्तर के तंत्रों को स्पष्ट किया गया। MD सिमुलेशन्स और NMA का उपयोग करते हुए, हमने FHV कैप्सिड की एक पेंटामेरिक उप-संरचना की आंतरिक गतियों का विश्लेषण किया, जिसमें उप-संरचना की डायनेमिक्स पर आसपास के कैप्सिड के प्रभाव को ध्यान में रखा गया। हमने देखा कि मूल-राज्य डायनेमिक्स के एक एकल नॉर्मल मोड का γ-पेप्टाइड्स की प्रारंभिक रिलीज़ दिशा के साथ प्रमुख संबंध था। इस मोड के साथ MDeNM सिमुलेशन्स द्वारा सैम्पलिंग करने पर कैप्सिड में बड़े पैमाने पर संरचनात्मक पुनर्व्यवस्था और रिलीज़ के दौरान γ_A पेप्टाइड्स के अभिविन्यास में उलटफेर का संकेत मिला। इन निष्कर्षों का उपयोग प्रासंगिक सामूहिक चर की पहचान करने और बायस-एक्सचेंज मेटाडायनेमिक्स का उपयोग करके मुक्त ऊर्जा परिदृश्य को मैप करने के लिए किया गया, जिससे पेप्टाइड रिलीज़ के आणविक-स्तर के तंत्र को स्पष्ट किया जा सका।

तीसरे उद्देश्य में, हम लिपिड मेम्ब्रेन रिमॉडलिंग की जांच करते हैं, जो कई कोशिकीय प्रक्रियाओं के लिए महत्वपूर्ण है। धीमी डायनेमिक्स और बायसिंग विधियों के लिए प्रतिक्रिया समन्वयकों (RCs) के ज्ञान की कमी, लिपिड बाइलेयर्स में संरचनात्मक परिवर्तनों का अध्ययन करने के लिए ऑल-एटम सिमुलेशन्स के लिए एक चुनौती प्रस्तुत करती है। लिपिड-पानी हैमिल्टोनियन के एक ENM से व्युत्पन्न नॉर्मल मोड स्पेस में सिस्टम डायनेमिक्स को लैंग्विन डायनेमिक्स पर मैप करके, हमने बाइलेयर के कंपन डायनेमिक्स का वर्णन किया। मॉडल पैरामीटर्स निर्धारित करने के लिए ऑल-एटम MD सिमुलेशन्स का उपयोग किया जाता है, और बाइलेयर की संरचनात्मक, यांत्रिक और डायनेमिक गुणों के लिए लैंग्विन डायनेमिक्स की भविष्यवाणियों को MD सिमुलेशन्स और प्रयोगों के विरुद्ध सत्यापित किया जाता है। इस विधि ने DMPC और DPPC बाइलेयर्स में पोर्स निर्माण के लिए सामान्य RCs को स्पष्ट किया। पाथ-मेटाडायनेमिक्स और अम्ब्रेला सैम्पलिंग का उपयोग करके इन RCs के साथ संवर्धित सैम्पलिंग ने पोर्स निर्माण की उष्मागतिकी को उजागर किया और लिपिड सॉल्वेशन और पैकिंग की भूमिकाओं को रेखांकित किया।

प्रोटीन के संरचनात्मक संक्रमणों की सटीक पहचान का दवा अनुसंधान में महत्व, हमारे चौथे उद्देश्य में स्पष्ट होता है, जिसमें हाइपोक्सिया-इंड्यूसिबल फैक्टर 2 ($\mathrm{HIF\text{-}2}$) के एगोनिस्ट और एंटागोनिस्ट बाइंडिंग पर अलग-अलग संक्रमणों की जांच पर ध्यान केंद्रित किया गया। $\mathrm{HIF\text{-}2}$, जो कोशिकाओं को कम ऑक्सीजन परिस्थितियों में अनुकूलन के लिए महत्वपूर्ण है, का सक्रियण और अवरोधन दोनों ही कैंसर, गुर्दे की एनीमिया और तीव्र गुर्दे की चोट जैसे रोगों के उपचार में महत्वपूर्ण चिकित्सीय उपयोगिता रखते हैं। हमने दिखाया कि डॉकिंग-आधारित लिगैंड स्क्रीनिंग के लिए $\mathrm{HIF\text{-}2}$ की कई संरचनाएँ, जिनमें बाइंडिंग पॉकेट के विभिन्न रूप होते हैं, आवश्यक हैं ताकि बाइंडिंग डोमेन की प्लास्टिसिटी को प्रभावी ढंग से समझा जा सके। $\mathrm{HIF\text{-}2}$ के विभिन्न लिगैंड्स और डिकोइस के साथ ऑल-एटम MD सिमुलेशन का उपयोग करते हुए, हमने अलग-अलग प्रकार के लिगैंड्स से जुड़े अद्वितीय संरचनात्मक, गतिशील और ऊष्मागतिकीय परिवर्तनों की पहचान की। हमने लिगैंड-प्रेरित स्थानीय संरचनात्मक और गतिशील परिवर्तनों की एलोस्टेरिक प्रक्रिया का विश्लेषण किया, साथ ही उनके वैश्विक प्रभाव और संबंधित समय-सीमाओं का अध्ययन किया। हमारे निष्कर्षों ने यह दर्शाया कि विशिष्ट लिगैंड-प्रेरित संरचनात्मक परिवर्तन एगोनिस्ट और एंटागोनिस्ट को प्रभावी रूप से अलग कर सकते हैं, जिससे सक्रिय यौगिकों की पहचान में सहायता मिलती है और वर्चुअल स्क्रीनिंग में गलत सकारात्मक परिणामों को कम किया जा सकता है।

Contents

List of Figures

List of Tables

Abbreviations

AA	**A**ll **A**tomic
ANM	**A**nisotropic **N**etwork **M**odel
ARNT	**A**ryl hydrocarbon **R**eceptor **N**uclear **T**ranslocator
CG	**C**oarse **G**rained
CV	**C**ollective **V**ariable
D-MPNN	**D**irect **M**essage **P**assing **N**eural **N**etwork
ENM	**E**lastic **N**etwork **M**odel
FEL	**F**ree **E**nergy **L**andscape
FHV	**F**lock **H**ouse **V**irus
HIF	**H**ypoxia **I**nducible **F**actor
LRT	**L**inear **R**esponse **T**heory
MD	**M**olecular **D**ynamics
MDeNM	**M**olecular **D**ynamics with **e**xcited **N**ormal **M**odes
MFEP	**M**inimum **F**ree **E**nergy **P**athway
NMA	**N**ormal **M**ode **A**nalysis
PCV	**P**ath **C**ollective **V**ariable
RC	**R**eaction **C**oordinate
RMSD	**R**oot **M**ean **S**quared **D**eviation
RMSF	**R**oot **M**ean **S**quared **F**luctuations
uL-NMS	**u**ncoupled **L**angevin equations in the **N**ormal **M**odes **S**pace