

*На правах рукописи*



ФАТХУТДИНОВА  
Алиса Амировна

Анфолдинг и фолдинг белка по данным сверхбыстрой  
калориметрии

1.4.4. Физическая химия

АВТОРЕФЕРАТ  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата химических наук

Казань – 2023

Работа выполнена на кафедре физической химии Химического института им. А.М. Бутлерова Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

**Научные руководители:** кандидат химических наук, доцент  
**Мухаметзянов Тимур Анварович.**

**Официальные оппоненты:** доктор химических наук  
**Деркач Светлана Ростиславовна**  
Мурманский арктический университет, профессор кафедры химии Естественно-технологического института, г. Мурманск;

доктор химических наук  
**Селиванова Наталья Михайловна**  
Казанский национальный исследовательский технологический университет, профессор кафедры физической и коллоидной химии Института полимеров, г. Казань.

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
**Институт химии растворов им. Г.А. Крестова Российской академии наук, г. Иваново.**

Защита диссертации состоится **14 февраля 2024 года в 14 часов 30 минут** на заседании диссертационного совета **24.1.225.01** при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки «Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр Российской академии наук» по адресу: 420088, г. Казань, ул. Академика Арбузова, д. 8, ИОФХ им. А.Е. Арбузова – обособленное структурное подразделение ФИЦ КазНЦ РАН, конференц-зал.

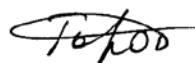
С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ИОФХ им. А.Е. Арбузова – обособленного структурного подразделения ФИЦ КазНЦ РАН и на сайте [www.iopc.ru](http://www.iopc.ru).

Отзывы на автореферат в двух экземплярах просим присылать по адресу: 420088, г. Казань, ул. Акад. Арбузова, д. 8, ИОФХ им. А.Е. Арбузова, ученому секретарю совета, e-mail: [toropchina@iopc.ru](mailto:toropchina@iopc.ru)

Автореферат разослан «8» декабря 2023 года.

Учёный секретарь диссертационного совета,

кандидат химических наук



А.В. Торопчина

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность работы.** Область исследования термической стабильности белков находится на стыке научных сфер – биологии, химии, физики и представляет интерес как с прикладной, так и фундаментальной точек зрения. Под действием повышенных температур разрушается нативное состояние белка, то есть происходит денатурация; при этом могут протекать различные процессы – как обратимые, так и необратимые. Для описания процесса необратимой денатурации часто применяют схему Ламри-Эйринга, согласно которой на первой стадии происходит обратимое разворачивание белка, то есть анфолдинг, а на второй стадии реализуются необратимые процессы денатурации, например, агрегация и химическая модификация белковой молекулы. При этом у многих белков равновесие анфолдинг/фолдинг устанавливается быстро, а процессы необратимой денатурации обычно являются относительно медленными.

Выявление закономерностей, определяющих термодинамическую и кинетическую устойчивости белков, в частности термодинамику и кинетику процессов анфолдинга и фолдинга, имеет большое значение для разработки и совершенствования процессов очистки белков с сохранением их биологических свойств, при изготовлении фармацевтических препаратов, пищевых добавок, в медицине при использовании белков в качестве биомаркеров и т.д. С фундаментальной точки зрения исследование процессов анфолдинга и фолдинга белка необходимо для развития представлений о факторах, определяющих структуру и свойства биомакромолекул.

Существует множество экспериментальных методов изучения белковых систем, среди которых важное место занимает сканирующая калориметрия. Дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК) применяется для измерения температур и тепловых эффектов анфолдинга белков и нуклеиновых кислот, оценки комплексообразования между биомакромолекулами и лигандами различной природы, исследования влияния среды на устойчивость биомолекул и т.д. В отличие от спектроскопических и структурных методов, ДСК позволяет проводить прямое измерение тепловых эффектов, сопровождающих конформационные изменения белка, в том числе процессы фолдинга и анфолдинга.

Классические ДСК, применяемые для исследования термостабильности белков, осуществляют нагрев и охлаждение образцов со скоростями от 0,01 до 2 К/мин, позволяя определять термодинамические параметры быстрых процессов фолдинга/анфолдинга, тогда как изучение кинетики этих процессов требует реализации значительно более широкого диапазона скоростей сканирования. Кроме того, длительное время измерения, обусловленное сравнительно низкими скоростями сканирования, способствует протеканию медленных процессов необратимой денатурации. В этой связи представляет интерес реализация калориметрических измерений белков со значительно более высокими скоростями нагрева и охлаждения.

Необходимо отметить, что в настоящее время наблюдается интенсивное

развитие методов сканирующей калориметрии. В последние годы важное значение приобрел метод неадиабатической сканирующей чип-калориметрии (сверхбыстрая калориметрия), среди преимуществ которого – высокие скорости нагрева и охлаждения (до  $10^6$  K/c), а также крайне малые размеры образцов. Получила распространение термомодулированная ДСК (ТМДСК), в том числе со ступенчатым сканированием. Последний метод интересен тем, что позволяет независимо оценить вклады обратимых и необратимых процессов в суммарный тепловой эффект.

Однако приходится констатировать, что на сегодняшний день эти методы имеют очень ограниченное применение в области исследования белков, хотя потенциально они могут расширить возможности традиционных методов, с помощью которых изучаются свойства и поведение биомакромолекул. Настоящая работа демонстрирует применение сверхбыстрой и термомодулированной калориметрии со ступенчатым нагревом для исследования процессов анфолдинга и фолдинга белка.

Таким образом, **целью работы** является создание подходов для изучения быстрых процессов анфолдинга и фолдинга белков на основе сверхбыстрой и термомодулированной калориметрии.

Для достижения этой цели были поставлены и решены следующие **задачи**:

1. Анализ необратимой денатурации модельного белка лизоцима методами дифференциальной сканирующей калориметрии, ИК-спектроскопии, спектроскопии кругового дихроизма и динамического светорассеяния;

2. Изучение кинетики и механизма анфолдинга и фолдинга лизоцима методом сверхбыстрой калориметрии:

- 2.1. Изучение изотермического фолдинга лизоцима в глицерине;

- 2.2. Изучение анфолдинга лизоцима методом ступенчатого нагрева;

3. Математическое моделирование процесса анфолдинга белка в режиме ступенчатого нагрева для установления связи между кинетикой анфолдинга и формой калориметрических кривых в режиме ступенчатого нагрева;

4. Определение критериев применения сверхбыстрой калориметрии в области исследования процессов анфолдинга и фолдинга белков

#### **Научная новизна:**

- На основе анализа результатов дифференциальной сканирующей калориметрии, ИК-спектроскопии, спектроскопии кругового дихроизма и динамического светорассеяния показано, что необратимая денатурация лизоцима при повышенных температурах вызвана протеканием процесса дезамидирования.

- На основе метода сверхбыстрой калориметрии впервые изучен процесс фолдинга лизоцима в глицерине. Определены кинетические параметры процесса, влияние температуры на скорость фолдинга, предложена кинетическая схема процесса фолдинга, включающая интермедиат, изучены свойства интермедиата фолдинга.

- На основе результатов математического моделирования процесса ступенчатого сканирования белка показано влияние кинетики процесса обратимого анфолдинга на форму калориметрических кривых со ступенчатым нагревом.

#### **Теоретическая и практическая значимость.**

Выполненная работа расширяет набор калориметрических подходов для исследования быстрых процессов анфолдинга/фолдинга белков. Подходы, предложенные в настоящей работе, могут быть использованы при исследовании термической стабильности белков и других биомакромолекул, как в рамках фундаментальных, так и прикладных исследований. Полученные в работе результаты демонстрируют, что современные калориметрические методы позволяют получать информацию не только о термодинамических параметрах быстрых процессов анфолдинга/фолдинга белка, но могут быть использованы и для анализа кинетики этих процессов. Кинетические закономерности фолдинга лизоцима в глицерине могут быть использованы для оптимизации процессов выделения и очистки белков.

#### **Методология и методы исследования.**

Поставленные в работе задачи решались набором физико-химических методов исследования. Для регистрации калориметрических кривых использовали капиллярный дифференциальный сканирующий калориметр TA Instruments nanoDSC (США), кривые методом сверхбыстрой калориметрии получали на сверхбыстрых калориметрах Mettler Toledo FlashDSC1 и FlashDSC2+ (Швейцария), а также Spark IV (Германия) с использованием калориметрических чип-сенсоров UFS1 и жидкостных сенсоров NanoLiq Xen-39400. Инфракрасные спектры получали на Фурье ИК-спектрометре Bruker Vertex 70 (Германия), спектры кругового дихроизма получали на КД-спектрометре Jasco J-1500 (Япония). Информацию о размере частиц в растворе получали с помощью прибора динамического светорассеяния Malvern Zetasizer Nano ZS (Великобритания).

Расчет теоретических кривых термомодуляционной ДСК со ступенчатым нагревом для процесса денатурации белка проводили методом численного интегрирования. Анализ кривых термомодуляционной ДСК в режиме ступенчатого нагрева проводили методом Фурье преобразования с помощью специально написанной программы.

#### **Основные положения, выносимые на защиту:**

Установлен механизм необратимой денатурации лизоцима в воде и смесях вода-ДМСО при повышенных температурах (выше 75 °С). Показано, что в результате денатурации образуются формы белка с пониженной термической стабильностью, но близкой к нативной конформацией. Определены кинетические параметры процесса.

Разработан калориметрический подход на основе сверхбыстрой калориметрии для изучения кинетики фолдинга лизоцима в глицерине.

Определены кинетические параметры процесса фолдинга лизоцима в глицерине, предложена кинетическая схема фолдинга лизоцима в глицерине.

На основе результатов математического моделирования процесса анфолдинга в ходе ступенчатого нагрева показана связь между кинетикой обратимого анфолдинга и формой калориметрических кривых ступенчатого нагрева.

Реализация ступенчатого нагрева на классических ДСК и сверхбыстрых калориметрах позволяет улучшить качество экспериментальных данных и реализовать квазиравновесный режим нагрева на сверхбыстром калориметре.

**Личный вклад автора.** Автором получены все экспериментальные данные, представленные в работе; проведен анализ литературы, математическая обработка экспериментальных данных; выполнено обобщение полученных результатов.

**Работа выполнена** на кафедре физической химии Химического института им. А.М. Бутлерова Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Казанский (Приволжский) Федеральный Университет» при поддержке гранта РФФИ по проекту № 20-34-90140 по теме «Термостабильность белка по данным мультимодальной термомодулированной калориметрии», гранта МинОбрНауки РФ № 14.Y26.31.0019, программы стратегического академического лидерства «Приоритет-2030».

**Апробация работы.** Основные результаты работы были представлены на Международной конференции SEEC-TAC&Medicta 2019 (Рим, Италия, 2019), IV Международной конференции 4<sup>th</sup> Flash DSC Conference 2019 (Цюрих, Швейцария, 2019), XXVIII Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (Москва, Россия, 2021), XXIX Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (Москва, Россия, 2022), XXIII Международной конференции по химической термодинамике в России RCST-2022 (Казань, Россия, 2022), Итоговой научно-практической конференции профессорско-преподавательского состава института физики и Химического института им. А.М. Бутлерова КФУ (Казань, Россия, 2023).

**Публикации.** Основные результаты диссертационного исследования изложены в 3 статьях в рецензируемых научных журналах, индексируемых в WoS и Scopus, а также в 6 тезисах докладов на международных научных конференциях. Все публикации по теме диссертации написаны в соавторстве с научным руководителем Мухаметзяновым Т.А. (к.х.н., доцентом кафедры Физической химии Химического института им. А.М. Бутлерова).

**Объем и структура диссертации.** Диссертация состоит из введения, 3 глав, заключения и списка литературы из 222 ссылок. Работа изложена на 151 странице, содержит 56 рисунков, 2 таблицы и 2 схемы.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **введении** диссертации обоснована актуальность работы, обозначены научная новизна, теоретическая и практическая значимость, задана цель и сформулированы задачи исследования.

**Первая глава** – литературный обзор, состоит из четырех разделов. В первом разделе изложены представления о фолдинге белков, показаны актуальные задачи в этой области, обсуждаются понятия денатурация и анфолдинг, описывается связь процессов анфолдинга и денатурации с фолдингом. Во втором разделе рассмотрены экспериментальные методики, применяющиеся для наблюдения за состоянием белка; даны характеристики спектроскопических (1.2.1) и калориметрических (1.2.2) методов анализа. В третьем разделе внимание направлено на развитие и применение современных калориметрических методик: сверхбыстрой калориметрии (1.3.1) и термомодулированной калориметрии (1.3.2). Четвертый раздел посвящен описанию объекта исследования – модельного белка лизоцима.

**Вторая глава** – экспериментальная часть, содержит описание использованных в работе материалов, оборудования, применявшегося в ходе выполнения работы.

**Третья глава** – результаты и обсуждение.

Работа посвящена экспериментальному исследованию термодинамических и кинетических характеристик процессов анфолдинга (разворачивание белка из упорядоченного компактного (нативного) состояния в неупорядоченное) и фолдинга (сворачивание белка из неупорядоченного в упорядоченное компактное состояние), а также необратимых процессов денатурации. Основным используемым экспериментальным методом является сканирующая калориметрия (классическая ДСК и сверхбыстрая калориметрия), которая позволяет зафиксировать тепловые эффекты, сопровождающие процессы анфолдинга и фолдинга белка.

Глава состоит из четырех разделов:

**3.1 Анализ необратимой денатурации модельного белка лизоцима методами дифференциальной сканирующей калориметрии, ИК-спектроскопии, спектроскопии кругового дихроизма и динамического светорассеяния.**

*3.1.1 Калориметрическое исследование необратимой денатурации лизоцима*

При нагреве раствора лизоцима на кривой ДСК наблюдается эндотермический эффект анфолдинга белка. В ходе повторных нагревов того же образца белка на калориметрических кривых появляется дополнительный низкотемпературный тепловой эффект, а основной калориметрический эффект анфолдинга уменьшается по сравнению с первым нагревом. Аналогичные явления наблюдаются, если перед регистрацией кривой ДСК образец выдерживался при повышенной температуре. На Рисунке 1 приведены кривые ДСК растворов лизоцима в воде и смесях вода-

диметилсульфоксид (вода-ДМСО) до и после выдерживания в течение 1-3 часов при температуре 85°C.

Появление и последующий рост величины дополнительного низкотемпературного эффекта указывает на растущее содержание формы лизоцима с пониженной термостабильностью, в то время как уменьшение основного теплового эффекта свидетельствует о снижении содержания исходной (нативной) формы белка. Эти наблюдения позволяют заключить, что повышение температуры или увеличение продолжительности высокотемпературного выдерживания ведут к необратимой денатурации лизоцима.

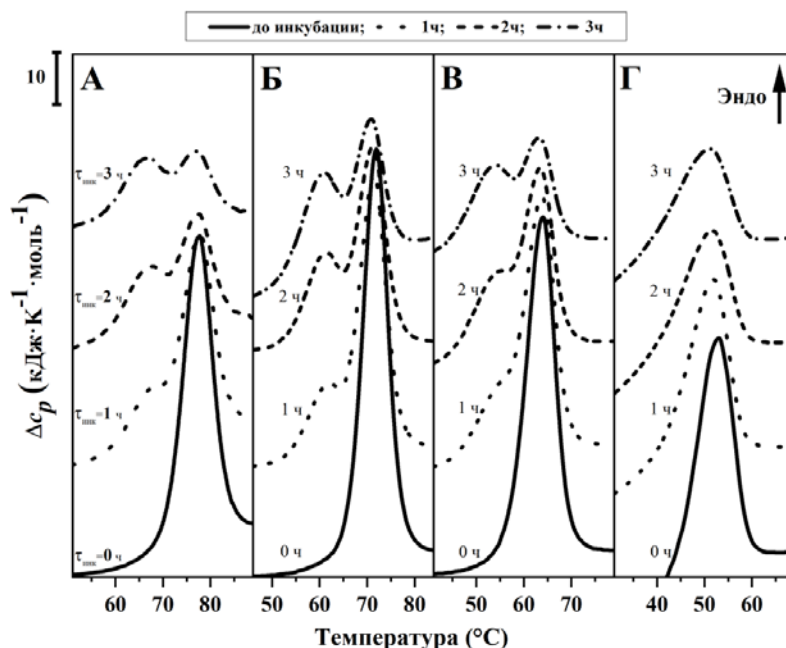


Рисунок 1 – Калориметрические кривые нагрева растворов лизоцима в воде и смесях вода-ДМСО в зависимости от продолжительности выдерживания при 85°C. Мольная доля ДМСО А)  $x_{\text{ДМСО}}=0$ ; Б)  $x_{\text{ДМСО}}=0,1$ ; В)  $x_{\text{ДМСО}}=0,2$ ; Г)  $x_{\text{ДМСО}}=0,3$ .

### 3.1.2 Исследование необратимой денатурации лизоцима методами ИК-спектроскопии, спектроскопии кругового дихроизма и динамического светорассеяния

Данные спектроскопии кругового дихроизма (КД) и ИК спектроскопии демонстрируют отсутствие значимых изменений в спектрах водного раствора белка после термической обработки (Рисунок 2А). Спектры КД, зарегистрированные в области поглощения ароматических групп белка, отражают состояние третичной структуры; сигнал представлен в виде g-фактора (отношение сигнала дихроизма к оптической плотности раствора). В смеси вода-ДМСО с мольной долей органического растворителя  $x_{\text{ДМСО}} \leq 0,2$  форма спектров КД также не претерпевает значительных изменений после термической обработки (Рисунок 2 Б,В), и только в смесях вода-ДМСО с мольной долей  $x_{\text{ДМСО}}=0,3$  интенсивность полосы в ароматической области



заметно снижается (Рисунок Г). Штрих-пунктирная линия, изображенная на Рисунке 2 Г, показывает спектр КД развернутого лизоцима (белок, растворенный в смеси вода-ДМСО с  $x_{\text{ДМСО}}=0,4$  переходит в развернутое состояние уже при комнатной температуре).

Анализ ИК-спектров лизоцима показывает, что вторичная структура лизоцима так же, как и третичная, не претерпевает значимых превращений, поскольку термическая обработка лизоцима не приводит к существенным изменениям в форме полосы Амид-I.

Таким образом, полученные спектры ИК и КД не обнаруживают существенных изменений конформации молекул белка, то есть менее термически стабильная форма лизоцима, образующаяся в результате термического воздействия, имеет конформацию близкую к нативной.

Результаты анализа динамического светорассеяния показали, что высокотемпературное выдерживание не приводит к изменениям в распределении белковых частиц по размерам, поэтому появление форм белка с пониженной термической стабильностью не является следствием агрегации. В то же время, замечено некоторое снижение  $\zeta$ -потенциала, характеризующего заряд белковой молекулы.

Сопоставление результатов спектральных методик с калориметрическими наглядно показывает особую чувствительность калориметрического метода анализа к состоянию белковой смеси.

### 3.1.3 Механизм необратимой денатурации лизоцима

Анализ полученных в этой работе экспериментальных данных показал, что наблюдаемые в воде и смесях вода-ДМСО изменения вида калориметрических кривых после высокотемпературного выдерживания образца вызваны одним и тем же процессом, не вызывающим значительных конформационных изменений молекулы лизоцима и не связанным с агрегацией белка. Механизм этого процесса в литературе не был описан.

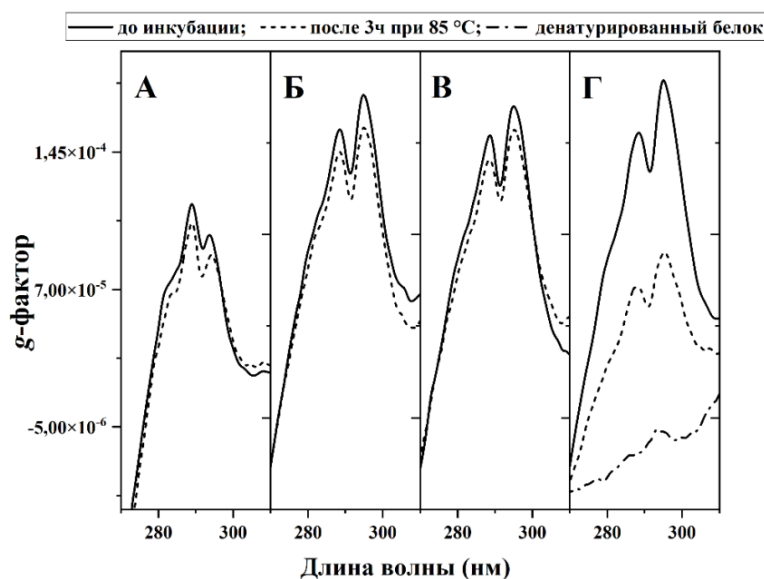


Рисунок 2 – Спектры кругового дихроизма в ароматической области для растворов лизоцима в воде и смесях вода-ДМСО до и после изотермического выдерживания при 85°С в течение 3 часов А)  $x_{\text{ДМСО}}=0$ ; Б)  $x_{\text{ДМСО}}=0,1$ ; В)  $x_{\text{ДМСО}}=0,2$ ; Г)  $x_{\text{ДМСО}}=0,3$ , и спектр развернутого белка, полученный в смеси вода-ДМСО с  $x_{\text{ДМСО}}=0,4$  при комнатной температуре.

Понимание механизма необратимой денатурации было получено при анализе более тонкой информации из ИК-спектров. Боковая полоса при  $1713\text{ см}^{-1}$ , появляющаяся в ИК-спектрах растворов белка после высокотемпературного выдерживания (Рисунок 3), соответствует  $\nu(\text{C}=\text{O})$  колебаниям карбоксильных групп Asp и Glu, которые могут образоваться в результате дезамидирования боковых цепей Asn и Gln. Рост интенсивности этой полосы коррелирует с ростом низкотемпературного эффекта и снижением величины основного теплового эффекта. Таким образом, низкотемпературный эффект, появляющийся на ДСК кривых лизоцима после воздействия повышенных температур, можно объяснить денатурацией белковых форм с пониженной за счет дезамидирования термостабильностью. Этот процесс также подтверждается наблюдаемым понижением  $\zeta$ -потенциала молекул лизоцима после высокотемпературного выдерживания.

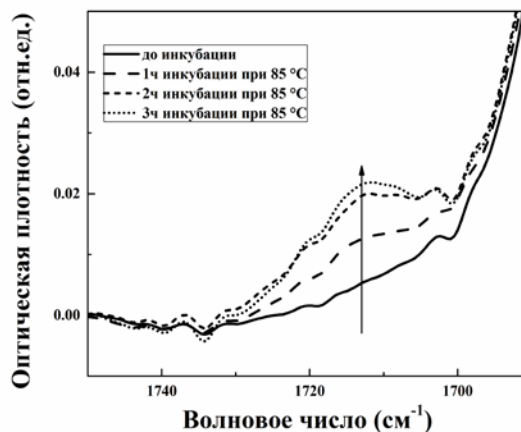


Рисунок 3 – Влияние выдерживания при  $85^\circ\text{C}$  на состояние лизоцима в воде по данным ИК-спектроскопии.

### 3.1.4 Кинетические параметры необратимой денатурации белка

Кинетика необратимой денатурации белка под действием высоких температур была изучена путем анализа калориметрических кривых белка, полученных после выдерживания при нескольких значениях температуры с

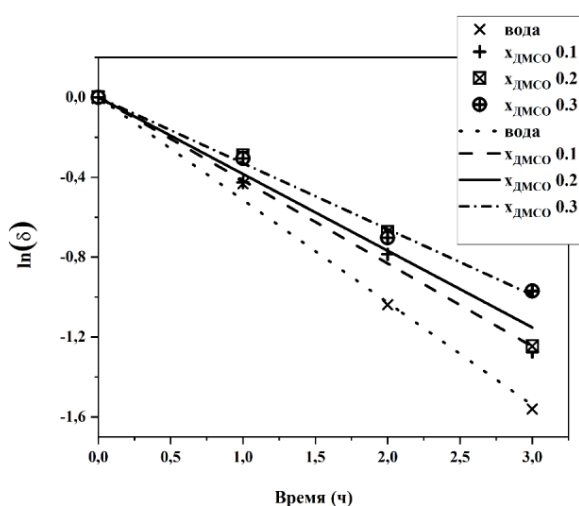


Рисунок 4 – Зависимость доли нативного лизоцима ( $\delta$ ) в воде и смесях вода-ДМСО от времени выдерживания при  $85^\circ\text{C}$ .

различной длительностью. По данным изотермических экспериментов при  $85^\circ\text{C}$  определена доля нативного белка ( $\delta$ ) как отношение высот основного теплового эффекта до и после выдерживания. Зависимость этой величины от времени имеет линейный вид в полулогарифмических координатах (Рисунок 4). На основе этой зависимости может быть определена эффективная константа скорости первого порядка процесса необратимой денатурации. Отмечается снижение эффек-

тивной константы скорости необратимой денатурации с увеличением концентрации ДМСО в растворе.

Оценка эффективной энергии активации необратимой денатурации

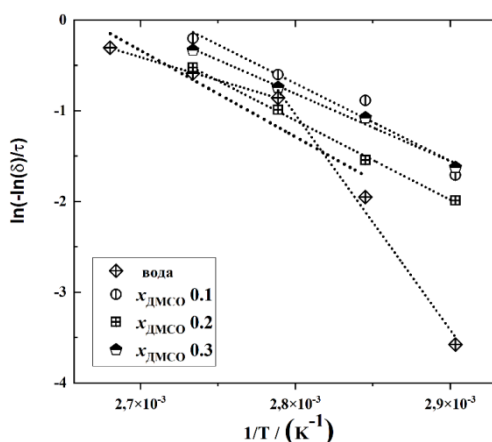


Рисунок 5 – Оценка эффективной энергии активации денатурации по данным изохронных экспериментов в воде и смесях вода-ДМСО.

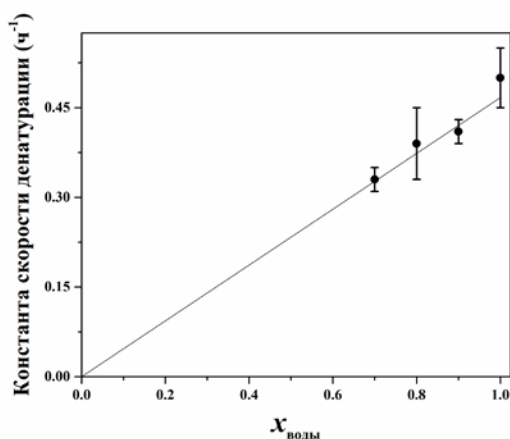


Рисунок 6 – Зависимость константы скорости необратимой денатурации от содержания воды в смеси вода-ДМСО.

свернутом состоянии, вероятно за счет меньшей конформационной подвижности молекул белка в водном окружении по сравнению с раствором вода-ДМСО.

Наблюдается линейная зависимость константы скорости необратимой денатурации от содержания воды (Рисунок 6) со свободным членом, близким к нулю, что можно объяснить участием молекулы воды в процессе дезамидирования.

Таким образом, анализ характеристик модельного белка лизоцима позволил указать на дезамидирование как на основную причину медленной необратимой денатурации белка, а сопоставление результатов спектроскопических методов и дифференциальной сканирующей

может быть произведена по зависимости величины доли нативного белка от температуры выдерживания при фиксированной его продолжительности (изохронный эксперимент). Исходя из предположения о первом порядке процесса, график в координатах  $\ln\left(-\frac{\ln(\delta)}{\tau}\right) - \frac{1}{T}$  имеет наклон, пропорциональный величине энергии активации (Рисунок 5). Полученные значения эффективной энергии активации процесса необратимой денатурации лизоцима в смесях вода-ДМСО очень близки и составляют около 100 кДж/моль. При этом в воде в температурном диапазоне выше температуры калориметрического эффекта наблюдается близкое значение эффективной энергии активации, а при более низкой температуре это значение возрастает, что может быть связано с тем, что процесс дезамидирования затруднен, когда белок находится в

калориметрии показывает, что метод ДСК способен обнаруживать изменения состояния белка, даже когда спектроскопические методики не показывают значительных искажений нативной конформации. Вместе с тем, небольшие скорости нагрева, доступные капиллярным ДСК, используемым для исследования растворов белка, ограничивают возможности метода в области анализа кинетики только такими процессами, которые протекают во временном масштабе десятков минут и часов, тогда как процессы фолдинга и анфолдинга белков протекают в течение секунд и даже долей секунды. Значительное повышение скорости нагрева и охлаждения может потенциально предоставить как минимум два преимущества – позволит изучать кинетику быстрых процессов обратимого анфолдинга и фолдинга и минимизирует протекание медленных необратимых процессов денатурации. Таким образом, представляет интерес разработка подходов для изучения процессов анфолдинга и фолдинга белка на основе сверхбыстрой калориметрии.

### 3.2 Исследование процессов анфолдинга и фолдинга лизоцима с помощью сверхбыстрой калориметрии

#### 3.2.1. Изотермический фолдинг лизоцима в глицерине

Высокие скорости сканирования, доступные методу сверхбыстрой калориметрии, позволили изучить кинетику фолдинга лизоцима в глицерине. Выбор растворителя обусловлен его низкой летучестью; при этом в литературе показано, что лизоцим в глицерине имеет конформацию, близкую

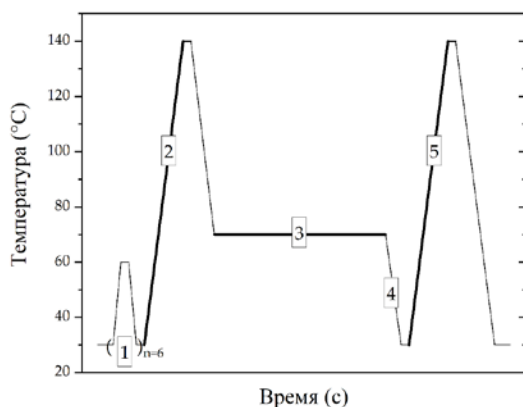


Рисунок 7 – Временной профиль температуры при исследовании фолдинга лизоцима в глицерине методом сверхбыстрой калориметрии. 1) предварительные циклы нагрев/охлаждение для удаления следов воды; 2) первый нагрев; 3) изотермическое выдерживание; 4) предварительное охлаждение; 5) второй нагрев, на котором определяется состояние белка после изотермического выдерживания.

к реализующейся в водных растворах. Эксперимент выполняли на сверхбыстром калориметре Mettler-Toledo FlashDSC1 с датчиком UFS1 по схеме, приведенной на Рисунке 7. Согласно этой схеме, на первом этапе образец белка нагревается и фиксируется эффект анфолдинга. Затем образец быстро охлаждается до заданной температуры, при которой возможен фолдинг белка, и выдерживается в течение определенного времени. Скорость охлаждения должна быть достаточно велика, чтобы белок не успел «свернуться» еще на этапе охлаждения. Состояние белка после изотермического вы-

держивания определяется путем проведения повторного нагрева. Наличие либо отсутствие теплового эффекта анфолдинга белка на повторном нагреве, форма и положение калориметрического пика несут информацию о состоянии молекул белка после изотермического выдерживания.

При коротких временах выдерживания при постоянной температуре белок не успевает восстановить исходную структуру и на кривой повторного нагрева тепловые эффекты не обнаруживаются (Рисунок 8, слева). После длительного выдерживания эффект анфолдинга на повторном скане практически совпадает с эффектом на первом нагреве, что говорит о восстановлении структуры белка (Рисунок 8, справа). При промежуточных временах выдерживания на кривых повторного нагрева наблюдается дополнительный низкотемпературный тепловой эффект, который со временем пропадает. Таким образом, обнаруживаемый низкотемпературный эффект не связан с процессом необратимой денатурации белка (в частности, с дезамидированием), а, по-видимому, является результатом формирования структуры, представляющей собой интермедиат в процессе фолдинга.

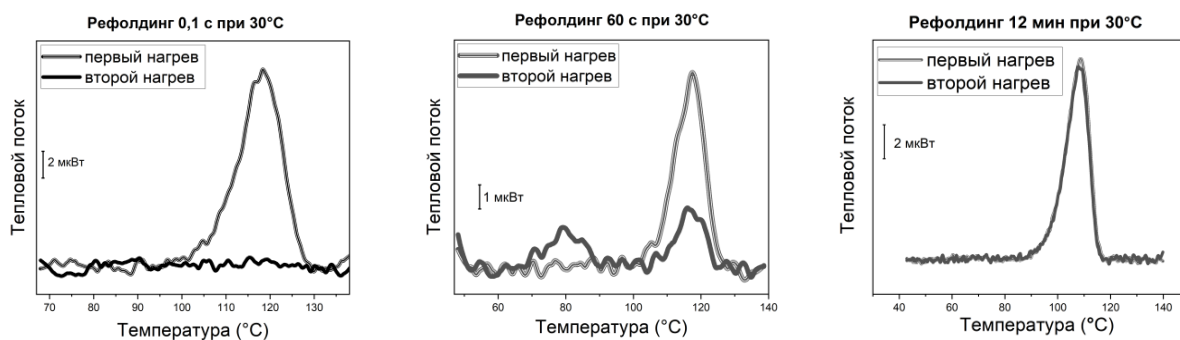


Рисунок 8 – Калориметрические кривые первого нагрева (сегмент 2 на рисунке 7) и второго нагрева (сегмент 5 на рисунке 7) образца лизоцима в глицерине на сверхбыстром калориметре. Показаны кривые после изотермического выдерживания при 30°C в течение 0,1 секунды (слева), 1 минуты (по центру) и 12 минут (справа).

Определение величины регистрируемых тепловых эффектов путем интегрирования калориметрических кривых позволяет построить кинетические кривые фолдинга. В качестве примера на Рисунке 9 представлены зависимости площадей основного и дополнительного эффектов, нормализованных на площадь теплового эффекта анфолдинга при первом нагреве, от времени изотермического выдерживания при 40°C. Зависимость площади основного теплового эффекта от длительности выдерживания была описана кинетическим уравнением первого порядка, что позволило вычислить эффективную константу скорости процесса сворачивания лизоцима в чистом глицерине при температурах от 10 до 70°C.



Анализ результатов, представленных на Рисунке 10, показывает увеличение скорости фолдинга с повышением температуры вплоть до 50°C ( $E_{a,эфф} = 92 \pm 6$  кДж/моль), а при более высоких температурах наблюдается обратное поведение. При этом, при температурах изотермического выдерживания выше 50°C не наблюдалось накопление интермедиата.

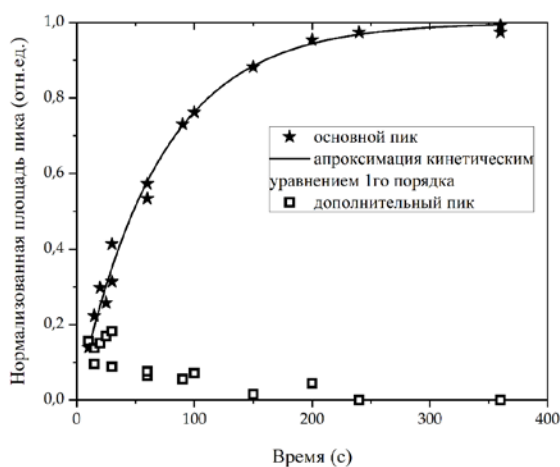


Рисунок 9 – Зависимость нормализованных площадей основного и низкотемпературного эффектов от длительности изотермического выдерживания при 40°C. Площадь эффектов на втором нагреве отнесена к площади эффекта на первом нагреве. Точки на графике получены из эксперимента, гладкая кривая – аппроксимация результатов кинетическим уравнением первого порядка.

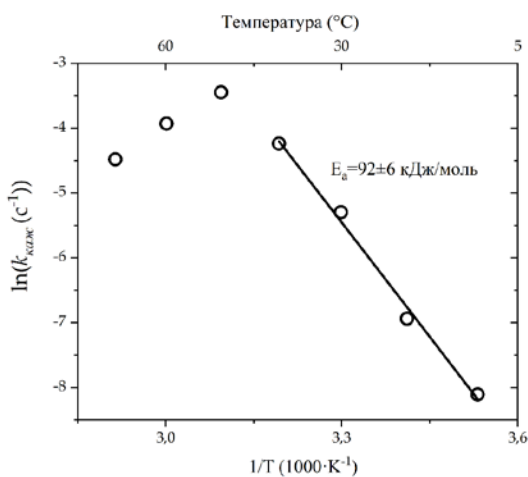


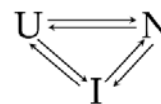
Рисунок 10 – Температурная зависимость эффективной константы скорости фолдинга в Арренiusовских координатах.

ресно отметить, что найденный механизм сворачивания лизоцима в глицерине совпадает с описанным в литературе механизмом сворачивания этого же белка в воде. С одной стороны, такой результат указывает на адекватность применения сверхбыстрой калориметрии для исследования фолдинга, а с

обратное поведение. При этом, при температурах изотермического выдерживания выше 50°C не наблюдалось накопление интермедиата.

### 3.2.2. Механизм фолдинга лизоцима в глицерине

Результаты исследования фолдинга лизоцима в глицерине методом сверхбыстрой калориметрии позволили заключить, что механизм может быть описан с помощью «треугольной» схемы:



Такая схема включает в себя три равновесия – между «развернутой» белковой молекулой  $U$ , корректно свернутой молекулой  $N$  и интермедиатом  $I$ . Прямой путь фолдинга является более медленным, чем путь через образование интермедиата. Но интермедиат имеет меньшую термостабильность, поэтому при температурах выше 50°C процесс сворачивания через образование интермедиата замедляется, что в итоге приводит к общему снижению скорости фолдинга при высоких температурах. Инте-

другой, показывает, что глицерин может быть использован как неводный растворитель – аналог воды, по крайней мере для некоторых белков.

Достоинством разработанной на основе сверхбыстрой калориметрии методики является возможность анализа термостабильности белковой системы в процессе фолдинга (то есть неравновесного ансамбля молекул белка). По полученным данным нами была оценена энтальпия анфолдинга интермедиата. Показано, что она составляет не менее 70% от величины энтальпии анфолдинга корректно свернутой формы белка. Кроме того, нами была определена эффективная энергия активации процесса анфолдинга интермедиата, которая составила  $142 \pm 13$  кДж/моль, это значительно ниже эффективной энергии активации анфолдинга корректно свернутого белка ( $240 \pm 29$  кДж/моль). Следует отметить, что при анализе калориметрических кривых важно обращать внимание на положение и форму теплового эффекта анфолдинга при повторном нагреве – отсутствие уширения основного теплового эффекта и малая ширина низкотемпературного эффекта свидетельствуют о высокой однородности свойств ансамбля молекул белка, формирующегося на пути фолдинга.

Таким образом, выполненная работа демонстрирует возможности метода сверхбыстрой калориметрии в области анализа механизма фолдинга белка на количественном уровне, а также позволяет провести оценку термостабильности неравновесной белковой системы.

Вместе с тем, высокие скорости нагрева, реализуемые методом сверхбыстрой калориметрии, не позволяют определить равновесные термодинамические параметры анфолдинга и фолдинга. При относительно низких для сверхбыстрой калориметрии скоростях сканирования (10 К/с и ниже) возникают сложности, связанные с низким соотношением сигнал/шум и искажениями формы калориметрической кривой. Для улучшения разрешения калориметрических кривых при относительно малых скоростях нагрева и реализации измерений в околоравновесных условиях в работе было выполнено измерение процесса анфолдинга методом термомодулированной ДСК со ступенчатым нагревом.

### *3.2.3. Анфолдинг лизоцима в глицерине по данным ТМДСК со ступенчатым нагревом*

В отличие от обычного метода ДСК, где скорость нагрева либо охлаждения постоянна во время калориметрического эксперимента, в методе термомодулированной дифференциальной сканирующей калориметрии (ТМДСК) скорость сканирования переменна во времени и обычно меняется по периодическому закону. Метод ТМДСК позволяет разделить составляющие теплового эффекта, относящиеся к реверсивным (у которых термическое равновесие устанавливается за период модуляции) и неревверсивным (у которых равновесие не может либо не успевает установиться). Режим ТМДСК со ступенчатым нагревом заключается в чередовании динамических (быстрый нагрев образца на температуру  $\Delta T$ ) и изотермических сегментов. Шаг температуры  $\Delta T$  обычно выбирается небольшим, продолжительность

изотермического сегмента должна существенно превышать длительность динамического.

Анализ калориметрических кривых с термомодуляцией ведется путем расчета величины так называемой комплексной теплоемкости, представляющей собой сумму двух вкладов. Действительная составляющая комплексной теплоемкости соответствует вкладу реверсивных (обратимых) процессов в суммарный тепловой поток, тогда как вклад нереверсивных (необратимых) процессов равен разности между средней теплоемкостью и вкладом реверсивных процессов. Соответствующая обработка кривой ступенчатого нагрева позволяет разделить составляющие теплового эффекта и вычислить кинетические и термодинамические параметры анфолдинга в рамках одного эксперимента.

Калориметрические кривые ступенчатого нагрева растворов лизоцима в глицерине были получены на сверхбыстрых калориметрах Mettler Toledo FlashDSC1 и FlashDSC2+ с датчиком UFS1 открытого типа. На Рисунке 11 представлена калориметрическая кривая, полученная с использованием температурной программы, состоящей из нагревательного сегмента со скоростью 100 К/с, шагом температуры 1 К и изотермы длительностью 0,49 с, таким образом, реализуется период модуляции 0,5 с и средняя скорость нагрева 2 К/с.

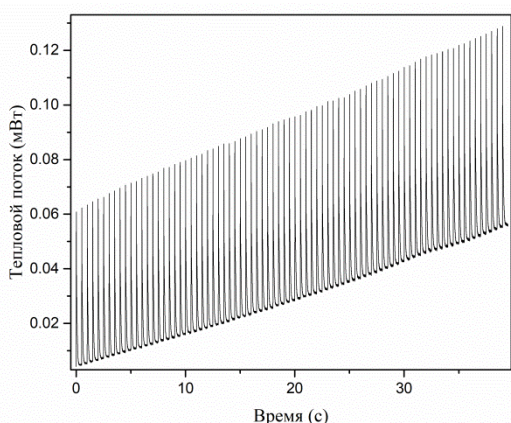


Рисунок 11 – Калориметрическая кривая со ступенчатым нагревом раствора лизоцима в глицерине. Период модуляции 0,5 с, шаг температуры 1 К, скорость на сегментах нагрева 100 К/с.

### Комплексная теплоемкость $C^*(\omega)$

вычисляется по уравнению

$$C^*(\omega) = C'(\omega) + iC''(\omega) = \frac{\sum_{i=1}^n \phi_{\Sigma,i} \cos(\omega\tau_i) + i \sum_{i=1}^n \phi_{\Sigma,i} \sin(\omega\tau_i)}{\sum_{i=1}^n \beta_i \cos(\omega\tau_i) + i \sum_{i=1}^n \beta_i \sin(\omega\tau_i)}$$

где  $C'(\omega)$  – действительная составляющая комплексной теплоемкости,  $C''(\omega)$  – мнимая составляющая.  $\phi_{\Sigma,i}$  и  $\beta_i$  – значения теплового потока и скорости сканирования в момент времени  $\tau_i$ .  $\omega = 2\pi/\tau_n$  – частота модуляции,  $\tau_n$  – период модуляции,  $n$  – число зафиксированных прибором в течение периода модуляции значений теплового потока.

Величина  $C'(\omega)$  характеризует вклад от реверсивных процессов,  $C''(\omega)$  – вклад от процессов, проходящих с «запаздыванием».

Величина  $C'(0) = \frac{\sum_{i=1}^n \phi_{\Sigma,i}}{\sum_{i=1}^n \beta_i}$  – средняя теплоемкость; является суммой вкладов от всех процессов. Разность  $C'(0) - C'(\omega)$  характеризует вклад от нереверсивных процессов.

Даже при относительно небольшой скорости обработка калориметрической кривой ступенчатого нагрева позволяет зафиксировать тепловой эффект анфолдинга (Рисунок 12, слева), в то время как в режиме непрерывного нагрева с такой же скоростью этот эффект практически незаметен. Также показано, что при относительно малой средней скорости нагрева (2К/с) анфолдинг в глицерине все еще проходит в кинетически необратимом режиме, т.е. система не



успевают приходить к равновесию за время изотермы. Об этом свидетельствует отсутствие пика на температурной зависимости действительной части комплексной теплоемкости (Рисунок 12 справа), тем не менее наличие скачка действительной составляющей однозначно показывает разность теплоемкостей между нативной и денатурированной формами белка в глицерине, что трудно заметить на кривых теплового потока, полученных в режиме непрерывного нагрева. Таким образом, реализация ступенчатого нагрева позволяет улучшить разрешение чип-калориметра при малых скоростях сканирования.

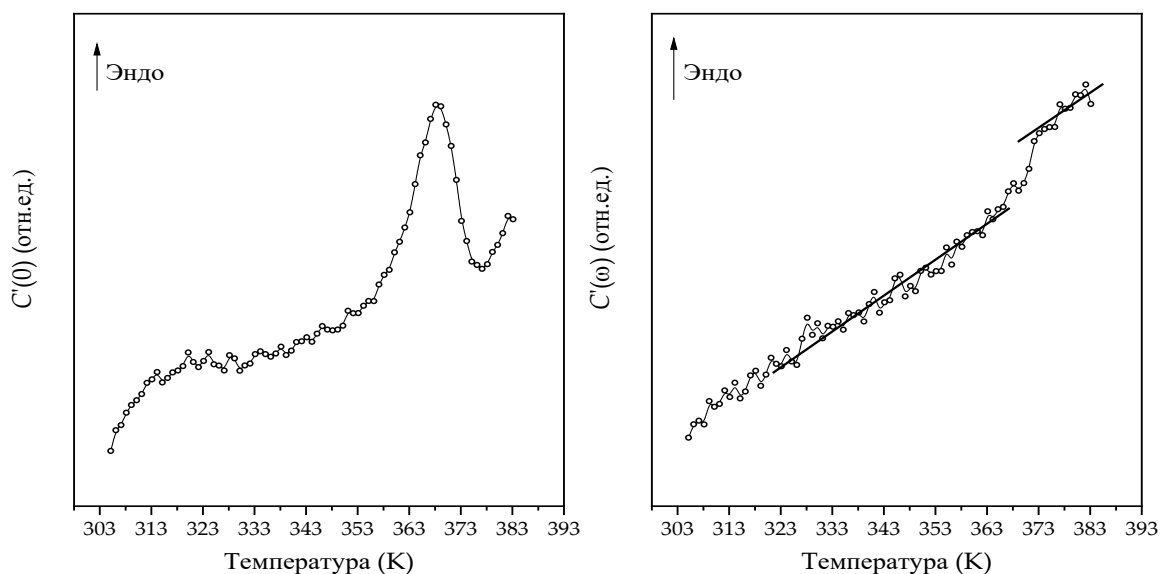


Рисунок 12 – Средняя теплоемкость образца ( $C'(0)$ ) лизоцима в глицерине, полученная в результате обработки кривой ступенчатого нагрева (слева); действительная составляющая комплексной теплоемкости ( $C'(\omega)$ ), полученная из того же эксперимента (справа); прямые линии добавлены для иллюстрации скачка теплоемкости.

### 3.2.4. Анфолдинг лизоцима в воде по данным ТМДСК со ступенчатым нагревом

Ступенчатый нагрев раствора лизоцима в воде был выполнен с использованием жидкостного калориметрического чипа NanoLiq Xen-39400. При осуществлении эксперимента с периодом модуляции 8 секунд и шагом нагрева в 1 градус (Рисунок 13, А) удастся реализовать квазиравновесные условия сканирования. Наличие пика действительной составляющей и отсутствие пика на мнимой составляющей комплексной теплоемкости означают, что система успевает прийти к равновесию за период модуляции (Рисунок 13, Б).

Таким образом, в зависимости от параметров ступенчатого нагрева может наблюдаться как квазиравновесный, так и кинетически необратимый режимы сканирования. Необходимо установить условия, в которых они реализуются.

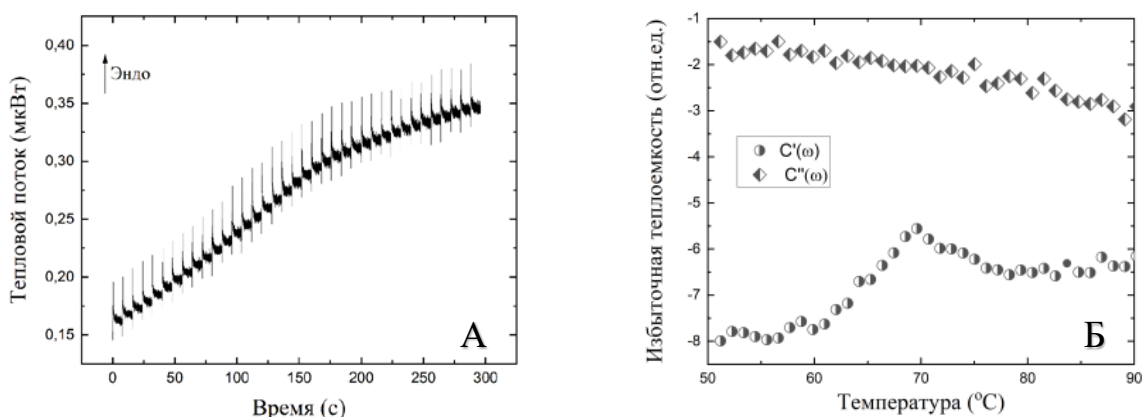


Рисунок 13 – А) Калориметрическая кривая анфолдинга лизоцима в воде, полученная методом ступенчатого нагрева (на жидкостном сверхбыстром чип калориметре FlashDSC2+). Период модуляции 8 с, длительность изотермического сегмента 7,99 с, скорость на сегментах нагрева 100 К/с; Б) изменение действительной и мнимой составляющих комплексной теплоемкости после обработки ступенчатой кривой А.

### 3.3. Математическое моделирование калориметрических кривых ТМДСК со ступенчатым нагревом

Для понимания связи между кинетикой процесса обратимого анфолдинга белка и формой калориметрических кривых ступенчатого нагрева было выполнено математическое моделирование калориметрических кривых ступенчатого нагрева белка.

Величина суммарного теплового потока ( $\phi_{\Sigma}$ ), регистрируемого в ходе ступенчатого нагрева, может быть разделена на три составляющие:  $\phi_{\Sigma} = \phi_C + \phi_{loss} + \phi_U$ , здесь  $\phi_C$  – тепловой поток, связанный с теплоемкостью образца, затрачивается на изменение температуры системы,  $\phi_{loss}$  – потери тепла, связанные с разностью температур между измерительной ячейкой и термостатом,  $\phi_U$  – тепловой поток, связанный с поглощением тепла в ходе анфолдинга. Эти вклады можно рассчитать по формулам справа.

Процесс анфолдинга моделировался в рамках одностадийной обратимой модели со следующими параметрами: энтальпия анфолдинга  $\Delta H(T_m)=450$  кДж/моль, температура анфолдинга  $T_m=323,15$  К (при которой свободные энергии обеих форм белка равны), разность теплоемкостей развернутой и свернутой форм белка  $\Delta_N^U C_p=6$  кДж/моль·К, энергия активации анфолдинга  $E_{a,N \rightarrow U}=550$  кДж/моль.

Калориметрические кривые рассчитывались дискретным интег-

#### Вклады в тепловой поток

рассчитывали по уравнениям:

$$\phi_C = \Delta C_p \beta; \phi_{loss} = a(T - T_0);$$

$$\phi_U = \frac{dH}{d\tau} = \frac{1}{\beta} \frac{dH}{dT} = \frac{\Delta_N^U H(T)}{\beta} \frac{dU}{dT};$$

$$\frac{dU}{d\tau} = -\frac{dN}{d\tau} = k_{N \rightarrow U}(1 - U) - k_{U \rightarrow N}U$$

где  $\Delta C_p$  – избыточная теплоемкость раствора,  $\beta$  – мгновенное значение скорости нагрева,  $T$  – температура образца,  $T_0$  – температура термостата,  $a$  – коэффициент теплопередачи,  $\Delta_N^U H(T)$  – энтальпия анфолдинга,  $U$  – содержание развернутой формы белка,  $N$  – содержание свернутой формы белка,  $k_{N \rightarrow U}$  – константа скорости анфолдинга,  $k_{U \rightarrow N}$  – константа скорости фолдинга.

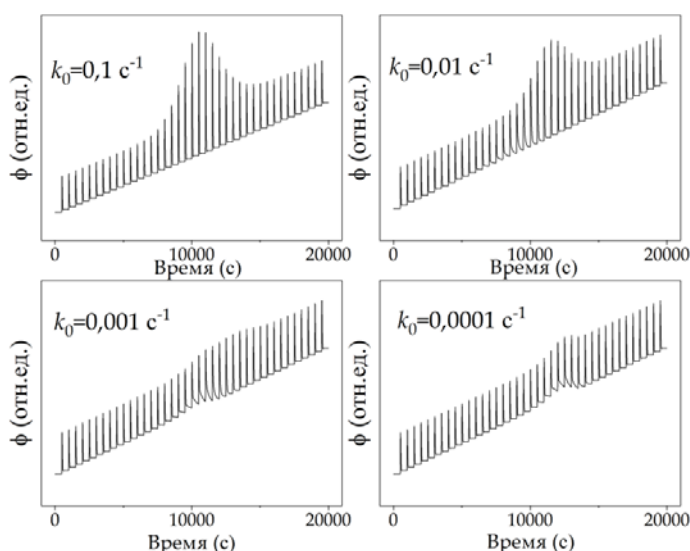


Рисунок 14 – Теоретические калориметрические кривые ступенчатого нагрева белка при разных величинах кинетической константы анфолдинга; период модуляции 500 с, шаг температуры 1 К.

чина константы скорости этих процессов при  $T_m$  ( $k_0 \equiv k_{N \rightarrow U}(T_m) = k_{U \rightarrow N}(T_m)$ ). Рисунки демонстрируют, что вид калориметрических кривых зависит от величины кинетической константы.

На Рисунке 15 показаны температурные зависимости действительной и мнимой составляющих комплексной теплоемкости, а также величины вклада нереверсивных эффектов в тепловой поток. Видно, что характер температурной зависимости этих величин тоже определяется величиной константы скорости  $k_0$ .

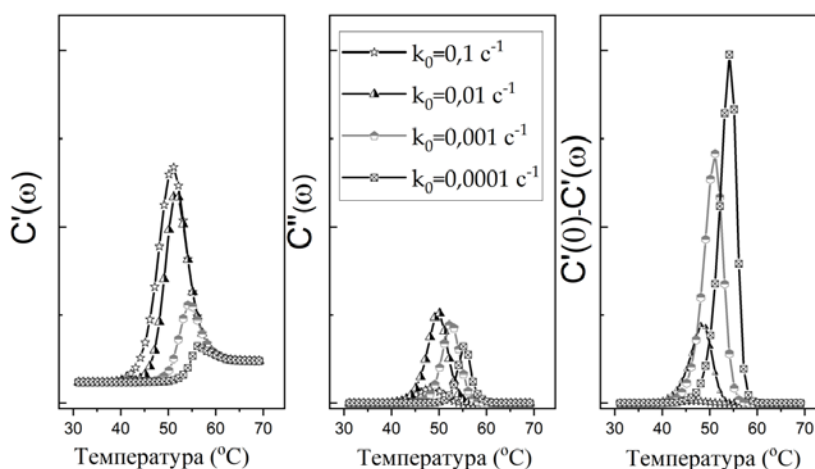


Рисунок 15 – Теоретические зависимости действительной ( $C'(\omega)$ , слева), мнимой ( $C''(\omega)$ , по центру) составляющих комплексной теплоемкости, а также вклада нереверсивных процессов ( $C'(0) - C'(\omega)$ , справа) от температуры при различных скоростях анфолдинга.

Квазиравновесный режим сканирования, признаком которого является отсутствие пика на температурной зависимости мнимой составляющей комплексной теплоемкости и наличие эффекта на температурной зависимости действительной составляющей, реализуется, когда величина произведения кинетической константы на период модуляции не меньше 50 ( $k_0 \cdot \tau \gtrsim 50$ ).

рированием дифференциального уравнения, определяющего содержание свернутой и развернутой форм белка, на основе заданного температурного профиля ступенчатого нагрева образца.

На Рисунке 14 приведено сравнение калориметрических кривых ступенчатого нагрева белка с различными скоростями процессов анфолдинга и фолдинга. Для характеристики скорости процессов анфолдинга/фолдинга использована вели-

Таким образом, математическое моделирование показывает связь между компонентами комплексной теплоемкости, рассчитываемыми по калориметрической кривой ступенчатого нагрева, и кинетикой процесса анфолдинга.

### **3.4 Сопоставление возможностей классического ДСК и сверхбыстрых калориметров в области исследования анфолдинга и фолдинга белков**

#### *3.4.1 ТМДСК со ступенчатым нагревом на классическом ДСК*

Режим ступенчатого нагрева, проанализированный в работе, был также реализован на классическом капиллярном ДСК TA Instruments nanoDSC. Установлено, что методика ступенчатого нагрева имеет ряд преимуществ по сравнению с непрерывным нагревом и в случае классического ДСК. Помимо возможности выделения реверсивных и неревверсивных вкладов в измеряемые тепловые эффекты, при использовании ступенчатого нагрева улучшается разрешение калориметрической кривой. Метод ступенчатого сканирования потенциально может быть использован для исследования низкотемпературных конформационных переходов молекул белка.

#### *3.4.2 Факторы, определяющие время отклика и отношение сигнал-шум калориметрических чип-сенсоров*

Как показывает выполненная работа, сверхбыстрые калориметры могут быть применены для изучения кинетики изотермического фолдинга белков и оценки свойств неравновесного состояния белка, реализующегося в процессе фолдинга, что невозможно осуществить с помощью классических ДСК. В настоящей работе такие измерения были выполнены с помощью открытых калориметрических чипов, обеспечивающих высокие скорости нагрева и охлаждения (до  $10^4$  K/c). Необходимым условием для применения таких чипов является низкая летучесть образца, что обеспечивалось использованием глицерина в качестве растворителя. Таким образом, открытые калориметрические чипы могут быть использованы для исследования биомакромолекул, сохраняющих компактную структуру и демонстрирующих тепловой эффект анфолдинга при нагреве в глицерине, либо других нелетучих растворителях.

Для анализа водных белковых растворов могут быть использованы жидкостные калориметрические чипы, однако, они имеют ограниченные скорости нагрева и охлаждения ( $\sim 500$  K/c). Сравнительно невысокая скорость охлаждения не позволяет использовать эти чипы для изучения изотермической кинетики фолдинга у белков, время сворачивания которых меньше  $\sim 0.1-0,5$  с, но при более медленном фолдинге такое исследование принципиально возможно. Вместе с тем для белков с быстрой кинетикой фолдинга с помощью жидкостных калориметрических чипов можно измерить квазиравновесные термодинамические параметры анфолдинга в режиме ступенчатого нагрева.

Необходимо учитывать, что по сравнению с высокочувствительными капиллярными классическими ДСК, применяющимися для анализа белковых растворов, чувствительность чип-сенсоров ограничена. Это требует применения высококонцентрированных растворов белка, в настоящей работе использовали раствор лизоцима в глицерине с концентрацией 50 мг/мл и воде 50-100 мг/мл. При планировании эксперимента на чип-калориметре, необходимо подбирать размер образца, в соответствии со свойствами белка, для получения оптимального соотношения сигнал/шум (SNR). Можно воспользоваться уравнением справа, которое показывает прямо пропорциональную зависимость величины SNR от массы белка. С другой стороны, повышение массы образца ведет к увеличению времени отклика калориметра пропорционально кубическому корню из массы, что накладывает верхнее ограничение на массу образца. Нужно подчеркнуть, что исключительно малые размеры образца, применяемые в чип-калориметрии, предполагают крайне малый расход белка. Например, в экспериментах с раствором лизоцима в глицерине типичная масса белка в одном образце составляла всего ~10-100 нг. Поэтому применение чип-калориметрии может быть полезным для анализа малых количеств белка, если возможно концентрирование раствора.

$$SNR \approx \frac{m \cdot \omega \cdot \Delta c_{p, \text{макс}} \cdot \beta}{100 \cdot N}$$

где  $m$ -масса образца,  $\omega$ -содержание белка (%<sub>масс</sub>),  $\Delta c_{p, \text{макс}}$ -избыточная теплоемкость в максимуме эффекта анфолдинга,  $\beta$ -скорость нагрева,  $N$ -собственный шум чип-калориметра.

Также нужно отметить, что высокие скорости нагрева, доступные сверхбыстрым калориметрам, сокращают время, которое образец проводит при высокой температуре, что позволяет практически исключить протекание процессов необратимой денатурации, таких как дезамидирование.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Показано, что с помощью метода сверхбыстрой калориметрии можно экспериментально определить кинетические параметры изотермического фолдинга и исследовать состояние неравновесного ансамбля молекул лизоцима в глицерине.
2. Определены кинетические параметры необратимой денатурации лизоцима при повышенных температурах в воде и смеси вода-ДМСО. Показано, что причиной появления форм лизоцима с пониженной термостабильностью и структурой близкой к нативной является реакция дезамидирования.
3. Определены кинетические параметры и механизм фолдинга лизоцима в глицерине, энергия активации и энтальпия анфолдинга интермедиата фолдинга.
4. Показано, что режим ступенчатого сканирования позволяет измерить тепловой эффект анфолдинга микрообразцов белка в квазиравновесных условиях с помощью сверхбыстрой калориметрии.

5. На основе математического моделирования показана зависимость формы кривых ступенчатого нагрева от параметров температурной модуляции и кинетики процесса анфолдинга. Показано, что величина произведения периода модуляции на константу скорости процесса обратимого анфолдинга определяет возможность реализации квазиравновесного режима сканирования.
6. Выработаны критерии, определяющие возможность использования сверхбыстрой калориметрии для исследования процессов анфолдинга и фолдинга белка, в зависимости от массы и концентрации образца, температурного интервала и теплового эффекта анфолдинга.

**Перспективы дальнейшей разработки темы.** Разработанные в ходе выполнения диссертационной работы подходы к исследованию анфолдинга и фолдинга белка с помощью сверхбыстрой калориметрии могут быть применены для исследования других белков, сохраняющих компактную структуру в глицерине, либо демонстрирующих замедленное сворачивание в воде по сравнению с лизоцимом. Для получения более полной информации о состоянии белка в процессе анфолдинга и фолдинга метод сверхбыстрой калориметрии может быть совмещен со спектроскопическими методами – ИК- и Раман-микроскопией. Кроме того, на основе результатов работы могут быть сформированы требования к новым сканирующим калориметрам, предназначенным для исследования растворов белков.

#### ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ ИЗЛОЖЕНО В СЛЕДУЮЩИХ ПУБЛИКАЦИЯХ И ТЕЗИСАХ КОНФЕРЕНЦИЙ:

1. Mukhametzyanov, T.A. Calorimetric observation of lysozyme degradation at elevated temperature in water and DMSO-water mixtures / T.A. Mukhametzyanov, **A.A. Fatkhutdinova**, I.A. Sedov, L.S. Yakimova, A.E. Klimovitskii // *Thermochimica Acta* – 2021 – Vol. 695 – 178826 – pp. 1-9;
2. **Fatkhutdinova, A.A.** Refolding of lysozyme in glycerol as studied by fast scanning calorimetry / A.A. Fatkhutdinova, T.A. Mukhametzyanov, C. Schick // *International Journal of Molecular Sciences* – 2022 – Vol. 23, №2773 – pp. 1-13;
3. Mukhametzyanov, T.A. Step-scan calorimetry of protein denaturation: modeling and experiment / T.A. Mukhametzyanov, **A.A. Fatkhutdinova**, C. Schick // *Thermochimica Acta* – 2022 – Vol. 710, 179181 – pp. 1-14;
4. Mukhametzyanov T.A. Unfolding and refolding of lysozyme dissolved in glycerol by Fast Scanning Calorimetry / T.A. Mukhametzyanov, **A.A. Fatkhutdinova**, I.A. Sedov, B.N. Solomonov, C. Schick // *Материалы международной конференции СЕЕС-ТАС&Medicta 2019 (Рим, Италия, 2019)*;

5. Mukhametzyanov, T.A. Investigating lysozyme unfolding and refolding using FlashDSC / T.A. Mukhametzyanov, **A.A. Fatkhutdinova**, I.A. Sedov, C. Schick // IV Международная конференция 4<sup>th</sup> Flash DSC Conference 2019 (Цюрих, Швейцария, 2019);
6. **Фатхутдинова, А.А.** Необратимая денатурация лизоцима в воде и смесях вода-ДМСО / А.А. Фатхутдинова // Материалы XXVIII Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (Москва, 2021);
7. **Фатхутдинова, А.А.** Денатурация лизоцима методом ступенчатой дифференциальной сканирующей калориметрии / А.А. Фатхутдинова, Т.А. Мухаметзянов // Материалы XXIX Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (Москва, 2022);
8. **Fatkhutdinova, A.A.** Step-scan differential scanning calorimetry for investigation of protein denaturation / A.A. Fatkhutdinova, T.A. Mukhametzyanov // Материалы XXIII Международной конференции по химической термодинамике в России RCST-2022 (Казань, 2022);
9. **Фатхутдинова, А.А.** Новые калориметрические методики изучения анфолдинга и рефолдинга белка / А.А. Фатхутдинова, Т.А. Мухаметзянов // Материалы итоговой научно-практической конференции профессорско-преподавательского состава института физики и Химического института им. А.М. Бутлерова КФУ (Казань, 2023).