

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

о диссертации Фатхутдиновой Алисы Амировны
«Анфолдинг и фолдинг белка по данным сверхбыстрой калориметрии»,
представленной на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности
1.4.4. Физическая химия

Кандидатская диссертация А.А. Фатхутдиновой посвящена изучению механизмов, обеспечивающих термическую устойчивость глобулярных белков, определению термодинамических и кинетических характеристик обратимых процессов анфолдинга и фолдинга, а также необратимых процессов денатурации нативного белка, протекающих под действием высоких температур. В качестве модельного глобулярного белка в работе использован лизоцим (фермент класса гидролаз), выделенный из яичного белка курицы; в качестве растворителей использованы: вода, смесь воды с диметилсульфоксидом, глицерин.

Оценивая *актуальность темы диссертационного исследования*, необходимо отметить следующее. Со времен открытия белков и выделения их в отдельный класс биологических молекул усилия ученых и исследователей, работающих в области химии и биологии, направлены на установление состава и строения белков, определяющих их многообразие и уникальность биологической функции каждого из них. Установлено, что функционирование белковых макромолекул тесно связано с определенностью их макромолекулярных структур. Даже небольшие изменения этих структур часто приводят к потере или резкому изменению биологической активности. И ничто не может быть актуальнее, чем выявление закономерностей, определяющих устойчивость белка с уникальными конформационными структурами его макромолекул. В сущности, этому же и посвящена диссертационная работа А.А. Фатхутдиновой применительно к проблеме термической устойчивости белков. Смысл диссертации состоит в разработке новых подходов к изучению обратимых процессов анфолдинга и фолдинга глобулярного белка, протекающих при высоких температурах и предшествующих процессам необратимой термической денатурации, с использованием методов сверхбыстрой и термомодулированной калориметрии.

Использование метода дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) для изучения белков, в частности получения термодинамических характеристик, достаточно широко распространено. Термодинамический анализ с помощью ДСК позволяет получать информацию о структуре белков, взаимодействиях с различными лигандами, обратимых конформационных превращениях, в том числе информацию о быстрых обратимых процессах анфолдинга/фолдинга (рефолдинга) и денатурации белков. Появление нового метода – сверхбыстрой ДСК, обладающего высокими скоростями нагрева и охлаждения образца до 10^6 К/с, может предоставлять уникальные возможности для изучения термической устойчивости белков, получения кинетической и теплофизической информации о быстрых процессах, протекающих в белках, и построения моделей денатурации и ренатурации белков. Именно преимущества сверхбыстрой ДСК, а также метода термомодулированной ДСК со ступенчатым сканированием для изучения быстрых обратимых конформационных изменений макромолекул белка в значительной мере раскрыты в работе А.А. Фатхутдиновой, что и позволяет говорить о диссертации как об актуальном научном исследовании.

Цель рассматриваемой диссертационной работы А.А. Фатхутдиновой, в первую очередь, состояла в создании подходов для изучения быстрых процессов анфолдинга и фолдинга белков на основе сверхбыстрой ДСК и термомодулированной ДСК.

Диссертация состоит из введения, 3 глав, заключения и списка литературы. Содержание работы изложено на 151 странице, содержит 56 рисунков, 2 таблицы и 2 схемы. Список литературы включает 222 наименования литературных источников.

Во введении диссертации изложена актуальность, научная новизна, теоретическая и практическая значимость, определены цель и задачи исследования. Первая глава посвящена литературному обзору по рассматриваемой теме. Вторая глава описывает экспериментальную часть, включая использованные в работе материалы, методы и оборудование. Третья глава посвящена описанию и обсуждению полученных экспериментальных результатов. В заключении изложены основные выводы, отражающие итоги работы.

Рассмотрим *конкретные результаты*, составляющие суть диссертации А.А. Фатхутдиновой, *степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации.*

Во-первых, как серьезное научное достижение, важное для рассматриваемой области, следует выделить разработку общего подхода к оценке изотермического фолдинга глобулярного белка (лизоцима) в неводном растворителе (глицерине) по данным сверхбыстрой ДСК, позволяющего обнаруживать наличие обратимых процессов формирования структур интермедиата, отличных от нативного белка. Конечно, это важно, поскольку разработанная методика, во-первых, демонстрирует уникальные возможности метода сверхбыстрой ДСК для анализа механизма фолдинга на количественном уровне (с определением энергии активации анфолдинга интермедиата), а во-вторых, позволяет оценить термоустойчивость белка, что безусловно является новым научным результатом.

Во-вторых, отмечая ограничения метода сверхбыстрой ДСК, связанные с определением равновесных термодинамических характеристик обратимых процессов, автор предлагает и развивает теплофизическую модель поведения макромолекулярных структур белка в режиме ступенчатого нагрева (чередование динамических и изотермических температурных режимов) с использованием метода термомодулированной ДСК. Здесь имеется несколько принципиальных вещей. Автор показывает возможность расчета комплексной теплоемкости, учитывающей вклады обратимых (реверсивных) и необратимых (неревверсионных) процессов в суммарный тепловой поток. Анализ калориметрических кривых с термомодуляцией позволяет разделить составляющие теплового эффекта и оценить термодинамические и кинетические параметры процесса анфолдинга белка, растворенного как в неводном растворителе (глицерине), так и в воде.

Автор предлагает математическую модель, связывающую температурные зависимости составляющих комплексной теплоемкости с кинетическими параметрами процесса анфолдинга белка. Результаты математического моделирования позволяют логически определить условия реализации квазиравновесного или кинетически необратимого режима процесса анфолдинга. Особенно ценно в предлагаемой модели то, что она в итоге приводит к расчету достаточно простого и наглядного критерия для реализации квазиравновесного режима сканирования (стр. 118 диссертации). Результаты математического моделирования представляет собой несомненное научное достижение автора.

В-третьих, в диссертационной работе А.А. Фатхутдиновой убедительно раскрываются возможности и преимущества классического метода ДСК для изучения необратимых медленных процессов денатурации белка, по сравнению со спектроскопическими методами (ИК- и КД-спектроскопия) и динамическим светорассеянием. Рассматривая механизм и кинетические закономерности необратимой денатурации лизоцима при высоких температурах, автор показывает, что реакция дезамидирования аминокислот аспарагина и глутамина является причиной снижения термостабильности белка, но при этом не приводящей к формированию конформационных структур, заметно отличающихся от нативного белка.

Сравнивая преимущества и ограничения различных методов ДСК, автор, не умоляя достоинства классического ДСК, подчеркивает, что сверхвысокие скорости нагрева сверхбыстрой калориметрии позволяют использовать короткие промежутки времени термического воздействия на образец, что исключает протекание необратимых процессов денатурации.

В-четвертых, диссертационная работа А.А. Фатхутдиновой содержит большой объем экспериментальных результатов, полученных на белковых системах с использованием различных растворителей. Уже сам банк этих данных представляет несомненную ценность и научную новизну. Не менее важно, что эти данные представлены в виде единой системы, в которой закономерно варьируются все основные параметры, определяющие исследуемое явление, размеры образца, скорость нагрева образца, температура, свойства растворителя. При этом весь объем полученных экспериментальных данных укладывается и количественно описывается обсуждаемыми механизмами денатурации и разработанной автором математической моделью. С практической точки зрения полученные результаты, в частности кинетические закономерности, могут быть использованы для совершенствования процессов выделения и очистки глобулярных белков, хотя этот вопрос требует отдельной проработки.

В-пятых, положительные впечатления производит продуманный перспективный взгляд автора на дальнейшее развитие проведенных исследований в части, касающейся анализа термической устойчивости других водорастворимых глобулярных белков, а также дальнейшего направленного совершенствования методов и методик сверхбыстрой ДСК и самих сканирующих калориметров для изучения белковых систем.

Достоверность и новизна научных положений, выводов и рекомендаций работы определяются использованием комплекса современных физико-химических методов, позволивших получить новые данные и набор параметров, характеризующих термодинамические, кинетические и структурные свойства глобулярного белка в растворенном состоянии, и взаимосогласованностью результатов, полученных для исследованных систем.

Таким образом, работа содержит обширный круг новых научных результатов, которые обосновывают представление диссертация по специальности 1.4.4. Физическая химия. При этом работа содержит полный комплект элементов, соответствующих паспорту научной специальности 1.4.4. Физическая химия: экспериментально-теоретическое определение энергетических параметров строения молекул и молекулярных соединений, а также их спектральных характеристик, экспериментальное определение термодинамических свойств веществ, расчет термодинамических функций простых и сложных систем, химические превращения, макрокинетика, методы математического моделирования механизмов превращений химических соединений.

Диссертационная работа А.А. Фатхутдиновой выполнена на высоком научном уровне, содержит новые научные результаты, имеющие теоретическую и практическую значимость. Научные положения, сформулированные в работе, выводы и представленные рекомендации обоснованы. Диссертация и ее автореферат хорошо оформлены. Графический и табличный материал в полной мере иллюстрирует теоретические и методические положения диссертации и полученные в ней экспериментальные результаты.

Кроме сделанных по ходу обсуждения работы отдельных замечаний, хотелось бы обратить внимание на следующее.

1. При рассмотрении предлагаемого механизма фолдинга лизоцима в глицерине на основе данных сверхбыстрой ДСК автор использует кинетическую модель квазиравновесного процесса с участием свернутой, развернутой структурой белка и промежуточных форм (интермедиатами фолдинга). В то же время автор не конкретизирует качественные параметры промежуточных форм белка в сравнении с известной трехмерной свернутой структурой. Известно, что некоторые нативные белки претерпевают конформационные переходы, которые не приводят к образованию денатурированного состояния. Такие переходы могут включать изменения от α -спиральной конформации к β -листовой (и наоборот). Возможно ли, что именно эти переходы формируют промежуточные формы?

2. На стр. 79 диссертации содержится один из основных научных результатов работы – это вывод о том, что на начальных стадиях необратимой термической денатурации лизоцима появляются дезамидированные формы белка с пониженной термостабильностью, сохраняющие структуру белка, близкую к нативной. В то же время автор не приводит уравнение (схему) реакции дезамидирования. Это бы позволило более детально рассмотреть изменение дзета-потенциала частиц белка и появление отрицательно заряженных групп взамен положительно заряженных.

3. Безусловно, развиваемый автором подход к рассмотрению обсуждаемого процесса рефолдинга глобулярного белка имеет право на жизнь, и автор доказал его применимость на основе большого массива экспериментальных данных. Однако, чем автор объясняет изначальный отказ от учета возможного четвертого состояния белка, а именно агрегированного белка?

Перечисленные замечания несколько не снижают общего, весьма благоприятного впечатления от диссертационной работы А.А. Фатхутдиновой, являющейся законченным, многоплановым исследованием, имеющим научное и прикладное значение.

Результаты диссертации опубликованы в 3 статьях в научных журналах, индексируемых в Web of Science и Scopus, представлены на международных и российских конференциях, по результатам которых опубликовано 6 работ в сборниках тезисов конференций. Публикации и автореферат полностью отражают основные научные результаты, положения, выводы и рекомендации, приведенные в диссертации.

В заключение следует отметить, что диссертационная работа А.А. Фатхутдиновой является завершенной научно-квалификационной работой, в которой решена актуальная задача физической химии, заключающаяся в разработке подходов для изучения быстрых процессов анфолдинга и фолдинга глобулярных белков на основе метода сверхбыстрой ДСК и термомодулированной ДСК.

Диссертационная работа Фатхутдиновой Алисы Амировны на тему «Анфолдинг и фолдинг белка по данным сверхбыстрой калориметрии» по своей актуальности, научной новизне, теоретической и практической ценности полученных результатов, значимости

основных положений и выводов полностью отвечает требованиям пунктов 9–11, 13, 14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 г. (в действующей редакции), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата химических наук, а ее автор Фатхутдинова Алиса Амировна заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.4. Физическая химия.

Официальный оппонент

профессор, доктор химических наук (02.00.11 Коллоидная химия), профессор кафедры химии Естественно-технологического института Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Мурманский арктический университет»

Деркач Светлана Ростиславовна
«26» января 2024 г.

Почтовый адрес организации: 183010, г. Мурманск, ул. Спортивная, д. 13
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Мурманский арктический университет»
Тел.: +7(8152)40-33-30
E-mail: derkachsr@mstu.edu.ru