

**Отзыв официального оппонента  
на диссертационную работу Фатхутдиновой Алисы Амировны  
«АНФОЛДИНГ И ФОЛДИНГ БЕЛКА ПО ДАННЫМ СВЕРХБЫСТРОЙ  
КАЛОРИМЕТРИИ»,  
представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук  
по специальности 1.4.4. Физическая химия**

Фолдинг белка является сложным процессом. Белки организуются в определенные трехмерные структуры посредством множества конформационных изменений. Классический взгляд на фолдинг белка описывает этот процесс как последовательную серию дискретных промежуточных продуктов. Напротив, теория сворачивания энергетического ландшафта рассматривает фолдинг как прогрессивную организацию ансамбля частично свернутых структур, через которые белок проходит на пути к нативно свернутой структуре. В результате эволюции белки имеют неровный воронкообразный ландшафт, смещенный в сторону нативной структуры. Однако, несмотря на 50 летний накопленный опыт, существует неопределенность по вопросам о том, как сворачиваются белки и почему они сворачиваются определенным образом. Экспериментальное исследование данных процессов представляется сложной задачей, требующей применения новых подходов, как в развитии экспериментальных техник, так и теоретических концепций для получения информации, необходимой для понимания механизма разворачивания и сворачивания белков.

Именно поэтому диссертационная работа Фатхутдиновой А. А., посвященная исследованию термодинамических и кинетических параметров процессов анфолдинга и фолдинга, а также необратимой денатурации лизоцима является актуальной для физической химии.

Работа Фатхутдиновой А. А. работа изложена на 151 странице, состоит из введения, трех глав, заключения, списка цитируемой литературы (222 источника), содержит 56 рисунков, 2 таблицы и 2 схемы.

**В литературном обзоре** рассмотрены общие сведения о процессах фолдинга/анфолдинга белков, термодинамические и кинетические подходы к изучению данных процессов. Отдельное внимание уделено экспериментальным методам исследования процессов фолдинга/анфолдинга белков, включая

спектроскопические, структурные и термические методы анализа. Описаны и проанализированы современные методы калориметрии, такие как сверхбыстрая и термомодулированная калориметрия. Анализ литературных данных, оформленный в отдельный раздел, позволил обоснованно выбрать объекты исследования, сформулировать цель и основные задачи работы.

**Во второй главе** экспериментальной части, представлены характеристики используемых реактивов. Описаны физико-химические методы исследования, применяемые в работе.

**Третья глава** посвящена обсуждению результатов исследования. Автор поэтапно проводит анализ необратимой денатурации модельного белка лизоцима классическими методами дифференциальной сканирующей калориметрии, ИК-спектроскопии, спектроскопии кругового дихроизма и динамического рассеяния света в водной и смешанной вода-ДМСО средах. Далее описывает результаты изучения процессов анфолдинга и фолдинга лизоцима с помощью сверхбыстрой и термомодулированной калориметрии. Применяя модель двух состояний, поведено моделирование калориметрических кривых ступенчатого нагрева. В заключении автор делает сопоставления возможностей классического ДСК и сверхбыстрой калориметрии для изучения анфолдинга и фолдинга белка.

**Результаты**, полученные Фатхутдиновой А.А., при выполнении работы, обладают **научной новизной, теоретической и практической значимостью.**

**Автором**, с использованием комплекса физико-химических методов анализа, изучена необратимая денатурация белка лизоцима. Установлено, что изотермическое (85 °С) выдерживание лизоцима в воде и в смесях вода-ДМСО приводит к необратимой денатурации лизоцима, при этом состояние вторичной структуры лизоцима не претерпевает изменений, а денатурация вызвана процессом дезамидирования. Исследование кинетики необратимой денатурации позволило оценить энергию активации процесса и выявить роль молекул воды в процессе дезамидирования боковой цепи.

**Впервые** на основе метода сверхбыстрой калориметрии изучен процесс фолдинга лизоцима. Автором отработана методика эксперимента. Показано, что в зависимости от температуры изотермического выдерживания реализуется различный механизм фолдинга: с образованием интермедиата в области температур

до 50 °C и «прямой» путь в диапазоне 50-70 °C. Лизоцим в глицерине демонстрирует высокую обратимость анфолдинга и отсутствие агрегации. Определены константы скорости процесса фолдинга при различных температурах. Анализ констант скоростей позволил выявить механизм фолдинга согласно треугольной кинетической схеме, включающей образование интермедиата. По методу Киссинджера определена эффективная энергия активации процесса анфолдинга нативной формы белка и интермедиата.

Методом термомодулированной дифференциальной сканирующей калориметрии проведена оценка температурной зависимости средней теплоемкости, выявлен эндотермический эффект анфолдинга белка в глицерине. Показано, что применение температурной модуляции на жидкостном чип сенсоре образца лизоцима в воде позволяет фиксировать тепловой эффект анфолдинга в квазиравновесных условиях.

**Впервые предложена математическая модель калориметрической кривой ступенчатого нагрева процесса обратимого анфолдинга белка, позволяющая обнаружить критерии реализации квазиравновесного режима. Автором выявлено влияние соотношения параметров моделирования (время периода модуляции и шаг температуры) и кинетики процесса анфолдинга (константы скорости) и термодинамических параметров ( $\Delta H$ ,  $\Delta C_p$ ) на форму калориметрических кривых.**

**Теоретическая значимость** данной работы заключается в разработанных подходах применения метода сверхбыстрой калориметрии для изучения сложных и быстрых многостадийных процессов биологических макромолекул. Предложенная математическая модель обратимого анфолдинга позволяет получить теоретические калориметрические кривые и определить критерии реализации квазиравновесных условий протекания процесса анфолдинга.

**Практическое значение** имеют установленные термодинамические и кинетические закономерности фолдинга лизоцима, которые могут использоваться для оптимизации процессов выделения и очистки белков. Предложенные автором методики выполнения эксперимента и обработки результатов, имеют методологическое значение и расширяют области применения сверхбыстрой калориметрии.

Диссертант при выполнении работы использовал комплекс современных методов исследования, что в сочетании с высоким уровнем обсуждения полученных результатов, сопоставления с известными литературными данными, не оставляет сомнений в их достоверности, а также **обоснованности сделанных на их основе научных положений и выводов.**

**Принципиальных замечаний к диссертации у меня нет.** В качестве замечаний и пожеланий хотелось бы отметить следующее:

1. В списке литературы современные публикации последних 5 лет составляют лишь 16 %. Хотелось бы увидеть срез современного состояния исследований в области изучения фолдинга/анфолдинга белка.
2. В главе 3.1.2 не представлены экспериментальные данные ДРС (размеры частиц, значения  $\xi$ -потенциала)
3. Отсутствует список сокращений.
4. В тексте диссертации присутствуют опечатки (с.10, рис. 4, 5 представлены на английском языке).
5. Хотелось бы выделить роль растворителя ДМСО в процессах фолдинга/анфолдинга лизоцима.

Данные замечания не снижают общей высокой оценки работы.

**Диссертация хорошо апробирована**, материалы работы докладывались на международных конференциях различного уровня.

**Автореферат и опубликованные в научной печати работы** (3 статьи в высокорейтинговых международных журналах, 6 тезисов докладов) **полно отражают основные научные результаты, положения и выводы**, приведенные в диссертации.

Оценивая диссертационную работу Фатхутдиновой А.А. «Анфолдинг и фолдинг белка по данным сверхбыстрой калориметрии», считаю, что она обладает актуальностью, научной новизной, практической значимостью, обоснованностью выводов и достоверностью полученных результатов, соответствует требованиям п. 9-11,13,14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24.09.2013 года (в действующей редакции), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, и является научно-квалификационной работой, в которой

содержится решение задачи установления параметров термодинамической и кинетической устойчивости лизоцима и закономерностей процессов фолдинга и анфолдинга, что имеет существенное значение для физической химии в аспекте развития метода сверхбыстрой калориметрии для получения термодинамических и кинетических параметров сложных и быстрых многостадийных процессов.

Считаю, что Фатхутдинова Алиса Амировна заслуживает присуждения ей ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.4. Физическая химия.

Доктор химических наук, доцент,  
профессор кафедры физической и коллоидной химии  
Федерального государственного бюджетного  
образовательного учреждения высшего образования  
«Казанский национальный исследовательский  
технологический университет»,  
специальность (02.00.04 - физическая химия)



Селиванова Наталья Михайловна

29.01.2024

