

У Т В Е Р Ж Д А Ю

Директор федерального государственного
бюджетного учреждения науки Институт
химии растворов им. Г.А. Крестова
Российской академии наук
Доктор химических наук

М.Г. Киселев

«15» января 2024 года

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт химии растворов
им. Г.А. Крестова Российской академии наук на диссертационную работу Фатхутдиновой

Алисы Амировны

АНФОЛДИНГ И ФОЛДИНГ БЕЛКА ПО ДАННЫМ СВЕРХБЫСТРОЙ КАЛОРИМЕТРИИ

представленную к защите на соискание ученой степени кандидата химических наук по
специальности 1.4.4. Физическая химия

Диссертация Фатхутдиновой А.А. посвящена определению кинетических и некоторых термодинамических характеристик процессов фолдинга и анфолдинга белков. Одной из важнейших проблем в этой области является экспериментальное исследование свойств неравновесных состояний белка, возникающих в ходе этих процессов. Для измерения термодинамических параметров процессов фолдинга и анфолдинга широко применяется сканирующая калориметрия. Однако невысокая скорость сканирования традиционных дифференциальных сканирующих калориметров фактически не позволяет использовать эту методику для изучения свойств неравновесных состояний белка. Вместе с тем в настоящее время все более широкое распространение приобретает метод сверхбыстрой калориметрии, который позволяет исследовать микроразмерные образцы в ходе нагрева и охлаждения со скоростями до 10^6 градусов в секунду. Ранее было показано, что этот метод позволяет регистрировать тепловые эффекты анфолдинга лизоцима в воде

и глицерине, что открывает перспективу его использования для комплексного исследования процессов фолдинга и анфолдинга. Фатхутдинова А.А. внесла существенный вклад в эту область исследования, предложив методики, которые позволяют определить кинетические и некоторые термодинамические параметры процессов фолдинга и анфолдинга лизоцима, а также изучить свойства интермедиата, возникающего в ходе фолдинга белка, с помощью метода сверхбыстрой калориметрии. Таким образом, диссертационная работа является **актуальной** и имеет **научную новизну**. Диссертантом показано, что дополнительный низкотемпературный тепловой эффект, наблюдающийся в ходе нагрева образцов лизоцима после их высокотемпературного выдерживания, связан с протеканием процесса дезамидирования. Этот результат позволил надежно идентифицировать аналогичный по виду тепловой эффект, наблюдаемый при сверхбыстром нагреве частично нативного лизоцима, как результат присутствия интермедиата. На основании измеренных кинетических кривых процесса фолдинга лизоцима в глицерине предложена кинетическая схема этого процесса. Показано, что использование сверхбыстрой калориметрии в режиме ступенчатого нагрева позволяет получить более полную информацию о характеристиках процесса анфолдинга, а в водных растворах позволяет получить квазиравновесные параметры анфолдинга микрообразцов белка. Также проведена оценка характеристик сверхбыстрых калориметров в аспекте их использования для исследования растворов белка. Полученные результаты, с одной стороны, демонстрируют возможность использования сверхбыстрой калориметрии для исследования процессов фолдинга и анфолдинга белка, с другой стороны, показывают уникальный пример фолдинга белка в неводном растворителе – глицерине.

Объем и структура диссертации

Диссертационная работа Фатхутдиновой А.А. изложена на 151 странице, содержит введение, 3 главы – литературный обзор, экспериментальную часть и обсуждение результатов, заключение, а также список цитируемой литературы, включающий 222 источника. Работа включает 56 рисунков и 2 таблицы.

Во **введении** изложены общая характеристика работы и формальные сведения о диссертации, обоснованы актуальность темы исследования, ее научная новизна, практическая и теоретическая значимости работы, изложены положения, выносимые на защиту, представлена информация об апробации работы.

В **первой главе** приведен **обзор литературы** по теме работы. Глава содержит четыре части; в первой обсуждаются основные современные представления о процессах фолдинга

и анфолдинга белков, во второй описаны экспериментальные подходы к изучению этих процессов, третья часть посвящена изложению принципов метода сверхбыстрой калориметрии, в четвертой части приведены характеристики модельного белка – лизоцима. На основании выполненного анализа литературных источников сформулированы цель и задачи работы.

Во **второй главе** рассмотрены экспериментальные характеристики использованных в работе материалов и оборудования, описаны методические аспекты пробоподготовки.

Третья глава диссертационной работы посвящена **обсуждению** полученных в ходе выполнения диссертационной работы **результатов**. В разделе 3.1 этой главы описаны результаты исследования необратимой денатурации модельного белка лизоцима широким спектром физических методов. Хотя сверхбыстрая калориметрия не была использована на данном этапе работы, но полученные в этом разделе результаты были применены для решения вопросов о природе дополнительных тепловых эффектов в ходе нагрева образцов белка с использованием метода сверхбыстрой калориметрии. Основным результатом работы – установление причин искажений калориметрических кривых после высокотемпературного выдерживания белка, подчеркивает значимость использования метода сверхбыстрой калориметрии, где значительно сокращается длительность действия высокой температуры на образцы белка. В разделе 3.2 описаны результаты экспериментального исследования процессов фолдинга и анфолдинга модельного белка лизоцима с помощью сверхбыстрой калориметрии. Фатхутдинова А.А. подробно изучила процесс фолдинга лизоцима в глицерине, показала, что в ходе сворачивания белка образуется интермедиат, показала, что наблюдаемые калориметрические кривые позволяют оценить состояние неравновесного ансамбля молекул белка, формирующегося в ходе фолдинга. Для исследования состояния белка был использован метод сканирующей калориметрии со ступенчатым нагревом, что позволило реализовать измерение процесса анфолдинга микрообразцов лизоцима в воде в квазиравновесных условиях. Следует отметить, что анализ калориметрических кривых ступенчатого нагрева является нетривиальным. Поэтому для объяснения взаимосвязи между параметрами, полученными в результате обработки таких калориметрических кривых, и кинетическими и термодинамическими параметрами процессов анфолдинга и фолдинга белка, автором выполнено математическое моделирование ступенчатого нагрева белка, описанное в разделе 3.3. В разделе 3.4 диссертации сопоставлены особенности исследования анфолдинга и фолдинга белков на обычных и сверхбыстрых калориметрах, даны рекомендации для повышения качества экспериментальных калориметрических кривых нагрева белка, полученных методом сверхбыстрой калориметрии.

В **заключении** изложены основные результаты и **выводы** диссертационной работы.

Автореферат соответствует диссертационной работе и является кратким изложением ее содержания.

Научная новизна результатов диссертационной работы заключается в следующем: с помощью анализа спектральных и калориметрических данных удалось показать, что в ходе выдерживания растворов лизоцима при повышенных температурах протекает процесс дезамидирования аминокислотных остатков белка, что приводит к появлению низкотемпературных тепловых эффектов на кривых ДСК. Процесс фолдинга лизоцима в глицерине впервые детально исследован методом сверхбыстрой калориметрии. Показано, что использование сверхбыстрой калориметрии позволяет не только получить кинетические кривые фолдинга белка, но и оценить состояние неравновесного ансамбля белка, возникающего в ходе фолдинга, на основе этих результатов предложена кинетическая схема фолдинга лизоцима в глицерине. Показано, что реализация метода ступенчатого нагрева позволяет зарегистрировать квазиравновесный эффект анфолдинга в микрообразцах растворов лизоцима. Выявлена взаимосвязь между кинетическими параметрами процессов анфолдинга и фолдинга и величинами реверсивных и нереверсивных вкладов в методе ступенчатого нагрева.

Достоверность полученных в работе результатов обусловлена использованием современных физических методов исследования, сопоставлением экспериментальных измерений с теоретическими моделями. **Обоснованность сделанных выводов** подтверждается апробацией работы. По результатам работы опубликованы 3 статьи (Q1 и Q2 по данным WoS), во всех из них Фатхутдинова А.А. является первым либо вторым автором. Также результаты были представлены на пяти международных конференциях.

Теоретическая и практическая значимость работы заключается в разработке новых калориметрических подходов к исследованию процессов анфолдинга и фолдинга белков, детальном исследовании процессов фолдинга лизоцима в глицерине. Полученные в работе результаты могут быть использованы для оптимизации процессов очистки и выделения белков. Продемонстрированная возможность изучения термостабильности микрообразцов белка представляет практический интерес в области разработки биокаталитических систем.

По **оформлению** работы имеются следующие замечания, не имеющие существенного характера:

1. В главе 3 два подраздела обозначены одним и тем же номером (3.2.2).
2. Рисунок 44 плохо отображается в цифровом варианте диссертации.
3. Схемы 1 и 2 фактически являются рисунками и могли бы быть включены в общую нумерацию рисунков.
4. Деление главы 3 на подразделы выглядит нелогичным. Можно было бы сгруппировать экспериментальные и теоретические результаты по методу ступенчатого нагрева в один раздел.

К содержанию диссертационной работы возникли следующие **замечания и вопросы**:

1. Мало внимания уделено сопоставлению результатов по фолдингу лизоцима в глицерине и имеющимся в литературе данным по стабильности и рефолдингу лизоцима в глицерине.
2. Как учитывалось испарение глицерина в ходе нагрева на сверхбыстрых калориметрах?
3. Ранее в работах сотрудников КФУ показано, что анфолдинг лизоцима в глицерине протекает по одностадийной схеме, а в настоящей работе предложена схема с интермедиатом. Как согласуются эти результаты?

Упомянутые недостатки и высказанные замечания не снижают ценности работы и не сказываются на ее общей положительной оценке.

Диссертационная работа Фатхутдиновой А.А. выполнена на высоком экспериментальном и теоретическом уровне, является значимым научным исследованием, расширяющим сферу применения современных калориметрических методов, и может являться основой для дальнейших работ в области сверхбыстрой калориметрии белков. Содержание диссертационной работы соответствует пунктам 2, 7, 9-10 паспорта специальности 1.4.4. Физическая химия.

Результаты работы могут быть использованы в научно-исследовательских организациях и университетах, в частности: Московском государственном университете им. М.В. Ломоносова и Институте биохимии им. А.Н. Баха (г. Москва), Институте цитологии (г. Санкт-Петербург), Институте цитологии и генетики (г. Новосибирск), Институте биологии и биотехнологии (г. Красноярск), Тихоокеанском институте биоорганической химии им. Г.Б. Елякова (г. Владивосток) и других.

Таким образом, диссертационная работа Фатхутдиновой Алисы Амировны «Анфолдинг и фолдинг белка по данным сверхбыстрой калориметрии» по актуальности

поставленной цели и решаемых задач, научной новизне, теоретической и практической значимости, а также достоверности полученных результатов **соответствует требованиям** «Положения о присуждении учёных степеней», утверждённого Постановлением Правительства РФ № 842 от 24 сентября 2013 г. в действующей редакции, **предъявляемым к диссертациям на соискание учёной степени кандидата химических наук**, а её автор, Фатхутдинова Алиса Амировна, заслуживает присуждения искомой учёной степени кандидата химических наук по специальности 1.4.4. Физическая химия.

Отзыв на диссертацию и автореферат обсуждён и одобрен на совместном заседании научного семинара «Физическая химия растворов и флюидов» и научно-исследовательского отдела 1 ИХР РАН (Протокол №1 от 10 января 2024 г.). Работа оценена положительно.

Отзыв составили:

профессор, доктор химических наук, руководитель научной группы, г.н.с. Института химии растворов им. Г.А. Крестова РАН

Колкер Аркадий Михайлович

доктор химических наук, доцент, заведующая лабораторией «Физическая химия супрамолекулярных систем на основе макроциклических соединений и полимеров» Института химии растворов им. Г.А. Крестова РАН

Лебедева Наталья Шамильевна

Адрес организации: 153045, г. Иваново, ул. Академическая, д. 1
Наименование организации: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химии растворов им. Г.А. Крестова Российской академии наук
Электронный адрес: adm@isc-ras.ru
Телефон: +7 (4932)336259