



"УТВЕРЖДАЮ"

Заместитель декана физического факультета
Ломоносова
профессор А.А. Федянин

"19" мая 2016 г.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Физического факультета федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова» о диссертационной работе «Связь фотофизических параметров тирозиновых остатков в сывороточных альбуминах с изменением структуры белка под влиянием лигандов и денатурации»

В период подготовки диссертации соискатель Жданова Надежда Григорьевна обучалась на кафедре квантовой электроники физического факультета федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова» в качестве аспирантки.

В 2012 г. Жданова Н. Г. окончила физический факультет федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова» с квалификацией «физик» по специальности «фундаментальная радиофизика и физическая электроника».

Удостоверение о прохождении аспирантуры и сдаче кандидатских экзаменов выдано 25 марта 2016 г. федеральным государственным бюджетным образовательным учреждением высшего профессионального образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова».

Научный руководитель – доктор физико-математических наук, профессор кафедры квантовой электроники физического факультета федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» Фадеев Виктор Владимирович.

По итогам обсуждения принято следующее заключение:

Диссертационная работа выполнена на кафедре квантовой электроники физического факультета МГУ. Научный руководитель – доктор физико-математических наук, профессор Фадеев Виктор Владимирович.

Работа выполнялась в период с 2012 по 2016 гг.

Цель работы: выявить влияние структурных изменений альбуминов на фотофизические параметры тирозиновых остатков и установить физических механизмов такого влияния.

Актуальность работы обусловлена высоким интересом к изучению проявления структурных изменений белков в их оптических характеристиках. В частности, это относится к альбумину – транспортному белку плазмы крови, выполняющему ряд важнейших функций в живом организме. Выявление оптических индикаторов состояния альбумина в растворе и в плазме крови является необходимым этапом разработки методов диагностики патологических процессов в организме на ранних стадиях. В то же время, использование флуоресцентного отклика белков в модельных системах позволяет выявить параметры локального окружения флуорофоров, влияющие на их энергетические уровни и переходы между ними. В настоящее время для этих целей используется флуоресценция триптофановых остатков («триптофановая флуоресценция»), параметры которой не всегда отражают изменение структуры макромолекулы белка, поэтому для дальнейшего развития оптических методов диагностики структурных изменений альбуминов актуальной задачей является комплексное исследование флуоресценции тирозиновых остатков («тирозиновой флуоресценции») и выявления факторов, влияющих на её параметры.

Обоснованность и достоверность:

Результаты, представленные в диссертации, получены на основе многократно повторенных экспериментов, проведенных на современном научном оборудовании с использованием современных методов обработки данных. Все используемые в экспериментах измерительные приборы были протестированы и откалиброваны, их инструментальная погрешность определялась независимо в ходе тестовых экспериментов с заведомо предсказуемыми результатами. Значительная часть экспериментальных результатов опубликована в рецензируемых журналах и представлена на российских и международных конференциях. Это позволяет считать полученные результаты обоснованными и достоверными, а также полностью отвечающими современному мировому уровню исследований

Личный вклад автора.

Все полученные в работе результаты являются оригинальными и получены лично автором. Вклад автора заключался в проведении всех представленных в оригинальной части работы экспериментальных исследований, обработки полученных данных, приготовлении всех исследуемых образцов и написании программного кода для обработки данных.

Научная новизна диссертационной работы состоит в следующем:

1. Впервые исследовано изменение параметров флуоресценции тирозиновых остатков в триптофан содержащих белках, в том числе, зарегистрировано изменение времени её затухания.
2. Впервые выявлены области альбумина, структурные изменения которых, влияют на фотофизические параметры тирозиновых остатков.
3. Впервые показано, что для ряда модельных систем, содержащих альбумин, тирозиновая флуоресценция является индикатором структурных изменений, которые не могут быть зарегистрированы по изменению фотофизических параметров триптофановых остатков.
4. Впервые показано, что низкий квантовый выход флуоресценции тирозиновых остатков в альбуминах является следствием взаимодействия с функциональными группами их локального окружения, а не обусловлен переносом энергии на триптофановые остатки по диполь-дипольному механизму.

Научная и практическая значимость работы состоит в расширении возможностей анализа собственной флуоресценции альбуминов для диагностики их структурных изменений путём использования зависимости флуоресцентных характеристик тирозиновых остатков в указанном типе белков для широкого круга систем, позволяющих моделировать специфичное и не специфичное связывание альбуминов с лигандами, а также их денатурацию. Результаты, полученные в данной работе показывают возможность разработки нового метода диагностики конформационных изменений, основанного на изменении фотофизических параметров тирозиновых остатков в белках при связывании с лигандами, не влияющем на флуоресценцию триптофана. Показано, что определение времени затухания тирозиновой флуоресценции в белке, содержащем триптофановые остатки, перспективно для создания нового метода диагностики патологии, независимого от уровня концентрации белков в плазме крови.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Флуоресценция тирозиновых остатков в альбуминах возрастает при специфичном связывании анионного детергента (SDS), а также при денатурации белка (под действием гидрохлорида гуанидина, SDS, катионного детергента СТАВ, этанола). При этом происходит снятие тушения флуоресценции за счёт удаления функциональных групп соседних с тирозином аминокислотных остатков (т.е. за счёт изменения его непосредственной окрестности), а не обуславливается уменьшением эффективности переноса энергии по диполь-дипольному механизму на триптофановые остатки.
2. Кинетика собственной флуоресценции сывороточного альбумина человека (САЧ) и бычьего сывороточного альбумина (БСА) в нативном состоянии, регистрируемая на длине волны 310 нм при возбуждении пикосекундными лазерными импульсами на длине волны 280 нм, описывается триэкспоненциальной зависимостью. При этом наименьшее время затухания флуоресценции является характеристикой тирозиновых остатков в указанных белках, а оставшиеся времена соответствуют временам дезактивации возбуждённого состояния триптофановых остатков. Данное утверждение справедливо для указанных белков и при добавлении анионного детергента (SDS), когда изменение времени затухания тирозиновой флуоресценции отражает взаимодействие между САЧ и SDS, что позволяет использовать данный фотофизический параметр тирозиновых остатков для характеристики изменения структуры альбуминов при связывании лигандов и денатурации.
3. Флуоресценция тирозиновых остатков альбумина позволяет зарегистрировать структурные изменения в домене I САЧ при специфичном связывании SDS и в домене III САЧ при денатурации гидрохлоридом гуанидина, которые не проявляются в триптофановой флуоресценции.
4. Усиление тирозиновой флуоресценции плазмы крови человека при добавлении анионного детергента (SDS) обусловлено только изменением собственной флуоресценции альбумина из-за его структурных перестроек при специфичном и не специфичном связывании SDS, при этом изменения флуоресценции тирозиновых остатков других белков, в частности иммуноглобулина гамма (второго по концентрации белка плазмы крови), не обнаружено.

Основные результаты работы являются оригинальными и опубликованы в следующих статьях:

1. а) И.А. Сергеева, Е.А. Ширшин, В.В. Гибизова, Г.П. Петрова, Н.Г. Жданова, С.А. Кургузенков, Е.А. Папиш, В.В. Фадеев, «Влияние катионов свинца на флуоресцентные характеристики бычьего сывороточного альбумина в водном растворе», *Оптика и спектроскопия*, 2013, т. 115, №2, с 22-27.
б) I.A. Sergeeva, E.A. Shirshin, N.G. Zhdanova, V.V. Gibisova, G.P. Petrova, S.A. Kurguzenkov, and V.V. Fadeev, "The Effect of Lead Cations on the Fluorescence Characteristics of Bovine Serum Albumin in Aqueous Solution", *Optics and Spectroscopy*, 2013, v. 115, pp. 171-176.
2. N.G. Zhdanova, E.A. Shirshin, E.G. Maksimov, I. M. Panchishin, A.M. Saletsky, and V.V. Fadeev, "Tyrosine fluorescence probing of the surfactant-induced conformational changes of albumin", *Photochemical and Photobiological Sciences*, 2015, 14 (5), pp. 897-908.
3. N. Zhdanova, E.A. Shirshin, I.M. Panchishin, and V.V. Fadeev. "Study of Tyrosine to Tryptophan Energy Transfer in Human Serum Albumin in Presence of Surfactant via Steady-State, Nonlinear and Time-Resolved Fluorescence Techniques", In: *Frontiers in Optics 2013*, I. Kang, D. Reitze, N. Alic, and D. Hagan, eds., 2013, OSA Technical Digest (online) (Optical Society of America, 2013), paper FTu1D.4. <http://www.opticsinfobase.org/abstract.cfm?URI=FiO-2013-FTu1D.4>.
4. N.G. Zhdanova, E.A. Shirshin, I.M. Panchishin, V.V. Fadeev, A.A. Maskevich, "On the possibility of indicating protein conformational changes via energy transfer between intrinsic fluorophores". In: *Nano-structures for Optics and Photonics*, B. Di Bartolo, J. Collins, L Silvestri, eds., Springer, 2015, p. 475-476
5. N. Zhdanova, E. Shirshin, V. Fadeev, A. Priezhev, "SDS-binding assay based on tyrosine fluorescence as a tool to determine binding properties of human serum albumin in blood plasma", *Proc. SPIE 9917, Saratov Fall Meeting 2015: Third International Symposium on Optics and Biophotonics and Seventh Finnish-Russian Photonics and Laser Symposium (PALS)*, 991713 (April 21, 2016)

Результаты работы представлены на следующих всероссийских и международных конференциях:

1. International OSA Network of Students (2013).
2. Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2013», Секция «Физика» (2013).
3. Научная конференция «Ломоносовские чтения 2013» (2013, 2015).
4. International Conference on Lasers, Applications, and Technologies LAT-2013 (2013).
5. 30th Course of NATO Advanced Study Institute: "Nano-structures for Optics and Photonics" (2013).
6. *Frontiers in Optics* (2013)
7. *Advanced Laser Technologies ALT-2015* (2015)
8. *Saratov Fall Meeting, International Symposium "Optics and Biophotonics"*, (2015)


Таким образом, диссертационная работа Н.Г. Ждановой «Связь фотофизических параметров тирозиновых остатков в сывороточных альбуминах с изменением структуры белка под влиянием лигандов и денатурации» безусловно удовлетворяет всем требованиям, предъявляемым ВАК России к диссертациям на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 01.04.05 – оптика.

Заключение принято на заседании кафедры квантовой электроники физического факультета МГУ.

Присутствовало на заседании 15 чел. Результаты голосования: “за” – 15 чел, “против” – нет, “воздержалось” – нет, протокол № 7 от “15” февраля 2016 г.

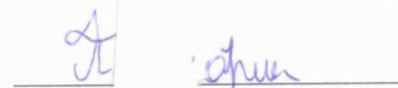
Заведующий кафедрой
квантовой электроники физического
факультета МГУ, профессор

В.И. Панов



Ученый секретарь кафедры
квантовой электроники физического
факультета МГУ, доцент

П.В. Елютин



Отделение радиофизики и электроники физического факультета МГУ рекомендует диссертационную работу на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук Н.Г. Ждановой «Связь фотофизических параметров тирозиновых остатков в сывороточных альбуминах с изменением структуры белка под влиянием лигандов и денатурации» к защите по специальности 01.04.05 – оптика.

Заведующий отделением
радиофизики и электроники
физического факультета МГУ,
профессор

В.А. Макаров

