

На правах рукописи

Лебеденко Степан Игоревич

**ЛАЗЕРНАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ КОМПОНЕНТОВ
СВЕТОИНДУЦИРУЕМОЙ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ РЕАКЦИИ**

Специальность 01.04.21 – лазерная физика

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Москва – 2007

Работа выполнена на кафедре общей физики и волновых процессов физического факультета Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова

Научный руководитель: доктор физико-математических наук
Чикишев Андрей Юрьевич

Официальные оппоненты: доктор физико-математических наук
профессор Фадеев Виктор Владимирович
кандидат химических наук
Правдин Александр Борисович

Ведущая организация:
Научно-исследовательский институт лазерных исследований химического факультета Санкт-Петербургского государственного университета

Защита состоится 18 октября 2007 года в 16 часов на заседании диссертационного совета Д 501.001.31 при МГУ им. М.В.Ломоносова по адресу: Россия, 119991, ГСП-1, Москва, Ленинские горы, МГУ, Корпус нелинейной оптики, аудитория С.А.Ахманова.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке физического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова.

Автореферат разослан «___» сентября 2007 года

Ученый секретарь диссертационного совета Д 501.001.31
кандидат физико-математических наук, доцент

Ильинова Т.М.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы диссертации

Знания о строении ферментов, их динамических свойствах, фермент-субстратных взаимодействиях и других аспектах молекулярных механизмов функционирования ферментативных систем чрезвычайно актуальны. Лазерная спектроскопия, в частности лазерная спектроскопия комбинационного рассеяния (КР), является одним из наиболее информативных методов изучения конформационного состояния биомолекул.

Важное место в современных исследованиях белков занимает разработка и применение кинетических методов, позволяющих изучать динамику функционирования ферментативных систем в реальном времени и с высоким разрешением. Основными подходами на сегодняшний день являются методы остановленного потока (stopped-flow), постоянного потока (constant-flow), метода гашения реакции (quenched-flow) и метода фотоуправления (метод вспышки, flash method). Разработанный в начале 1950-х метод вспышки является, пожалуй, наиболее эффективным способом управления ферментативной реакцией. В то же время ферментативная активность большинства белков-ферментов не поддается фотоуправлению напрямую. В начале 1970-х был предложен метод управления активностью фермента с помощью фоточувствительного субстрата-регулятора, однако процесс фотоуправления субстратом, его промежуточные состояния и эффективность преобразования субстрата-регулятора в необходимую форму до сих пор практически не исследованы. Поэтому одной из важнейших и актуальных задач является разработка метода лазерной подготовки субстрата-регулятора для реализации светоиндуцируемой ферментативной реакции.

Обработка КР спектров многих веществ, особенно биомолекул, осложняется наличием в них широкополосного фона. Интенсивность фона, как правило, на несколько порядков превосходит интенсивность КР линий исследуемого вещества. Несмотря на то, что эта проблема возникла в первых работах по КР спектроскопии, а ежегодно этому методу посвящается большое число работ, до сих пор единой точки зрения на природу этого явления не существует. В первую очередь, это связано с тем, что большинство исследователей воспринимает широкополосный фон лишь как помеху для получения информации о колебательных резонансах. В настоящее время известно несколько способов уменьшения интенсивности широкополосного фона по сравнению с

интенсивностью КР линий: перегонка, замораживание, использование лазерных источников в ближней инфракрасной области. Широко применяется способ фотообесцвечивания («выжигания») образца, основанный на уменьшении интенсивности широкополосного фона во времени при облучении образца лазерным излучением. Существование эффекта фотообесцвечивания растворов белков изначально объяснялось разрушением примесей-флуорофоров, поскольку сами молекулы белка не поглощают излучение видимого диапазона. В последнее время появились экспериментальные данные, позволяющие утверждать, что широкополосный фон определяется флуоресценцией самих биологических молекул, а не примесей. В этом случае наличие эффекта фотообесцвечивания может говорить о деструктивном характере воздействия излучения на биомолекулы. Таким образом, исследование фотообесцвечивания растворов биомолекул является актуальным и может раскрыть новые аспекты взаимодействия лазерного излучения с биомолекулами.

Известно, что в функционировании ферментов существенную роль могут играть низкочастотные (НЧ) колебания белковой молекулы. При этом КР спектры в НЧ области существенно различаются для одного и того же белка в твердом состоянии и в водном растворе, кроме того, в водных растворах наблюдение НЧ колебаний затруднено. Отсутствие ярко выраженных НЧ комбинационных резонансов в водных растворах белков большинство исследователей связывает с возможным демпфированием соответствующих колебаний водным окружением. Таким образом, вопрос о влиянии растворителей на НЧ колебания является весьма актуальным. Исследование влияния растворителей на НЧ колебания целесообразно проводить на примере простых органических молекул и дополнять экспериментальные результаты сравнительно несложным теоретическим анализом.

Цели и задачи

Целью настоящей работы является совершенствование методов изучения строения и динамических свойств ферментов, а также фермент-субстратных взаимодействий с использованием лазерной спектроскопии светоиндуцируемой ферментативной реакции.

В диссертационной работе решаются следующие задачи:

1. Установление зависимости параметров широкополосного фона от молекулярной массы и структуры биополимеров.
2. Выявление возможных причин немонотонного поведения интенсивности широкополосного фона во времени при облучении видимым лазерным излучением растворов белков.
3. Определение возможных изменений параметров низкочастотных колебательных резонансов белков под влиянием растворителей.
4. Определение оптимальной длины волны лазерного излучения и оптимальной дозы облучения для эффективной лазерной активации субстрата-регулятора светоиндуцируемой ферментативной реакции.

Научная новизна

1. Показано, что параметры широкополосного фона в КР спектрах растворов биомолекул зависят как от молекулярной массы, так и от конформационного состояния биомолекул.
2. С использованием спектроскопии оптического эффекта Керра, индуцированного комбинационным резонансом, получены спектры водного раствора белка в диапазоне от -4 до 4 см^{-1} .
3. Методом КР спектроскопии, показано, что влияние растворителя на низкочастотные колебательные резонансы растворенного вещества выражается в сдвиге, уширении и изменении формы линии. Наблюдаемые изменения не могут быть объяснены только изменением эффективного трения в присутствии молекул растворителя.
4. Охарактеризован метод подготовки (с использованием лазерного излучения) светочувствительного субстрата-регулятора для реализации светоиндуцируемой ферментативной реакции

Практическая ценность

Использование светочувствительного субстрата-регулятора, полученного с помощью охарактеризованного метода лазерной подготовки, позволяет реализовать

светоиндуцируемую ферментативную реакцию, запускаемую импульсом лазерного излучения. Это дает возможность исследовать динамические характеристики конформационного состояния фермента в реальном времени и получать уникальную информацию о связи структуры и функции ферментов.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. При отсутствии флуоресцирующих примесей и флуоресценции растворителя наблюдаемая интенсивность широкополосного фона в КР спектрах водных растворов белков и характерное время фотообесцвечивания зависят от конформационного состояния белка.
2. При анализе низкочастотных колебательных спектров белковых молекул в растворе влияние растворителя не может быть сведено к увеличению эффективного трения и должно исследоваться с учетом изменения частот и относительных интенсивностей линий колебательного спектра.
3. Предложенная лазерно-оптическая процедура позволяет эффективно нарабатывать необходимую форму субстрата-регулятора светоиндуцируемой ферментативной реакции (до 55% от исходного вещества, при длине волны лазерного излучении 325 нм и дозе облучения 6 МДж/моль), а также характеризовать и контролировать состав реакционной смеси.

Апробация работы.

По результатам диссертационной работы опубликовано 9 научных статей, из них 2 в журналах из списка ВАК России, и 10 тезисов докладов.

Результаты диссертационной работы докладывались на 9 международных конференциях: Austral-Asian Biospectroscopy Conference (Катат, Таиланд, 2003), Italian-Russian Laser Symposium ITARUS (Москва, Россия, 2003), Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2003» (Москва, Россия, 2003), International Workshop on Noise in Condensed Matter and Complex Systems (Палермо, Италия, 2004), International Conference on Coherent and Nonlinear Optics ICONO (Санкт-Петербург, Россия, 2005), European Congress on Molecular Spectroscopy (Стамбул, Турция, 2006), Workshop on Biophotonics and Molecular Simulations (Братислава, Словакия,

2006), International Conference on Coherent and Nonlinear Optics ICONO (Минск, Беларусь, 2007), International Conference on Laser Applications in Life Sciences LALS (Москва, Россия, 2007).

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, пяти глав и заключения. Работа изложена на 113 страницах, включает 52 рисунка, 5 таблиц и список литературы из 112 наименований.

Личный вклад автора

Все исследования методом лазерной КР спектроскопии, а также обработка и характеристика метода лазерного управления субстратом-регулятором светоиндуцируемой ферментативной реакции проведены автором лично. Результаты исследований, проведенных методом спектроскопии оптического эффекта Керра, индуцированного комбинационным резонансом, получены при определяющем вкладе автора в совместной работе. Результаты исследований методом ЯМР получены при личном участии автора в совместной работе. Анализ всех полученных результатов проведен автором лично.

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении дано краткое обоснование актуальности работы, сформулированы цель и задачи, научная новизна, практическая значимость и защищаемые положения работы, приведено краткое содержание каждой из глав диссертации.

Первая глава является обзорной. В разделе 1.1 описаны теоретические основы используемых в работе экспериментальных методик лазерной КР спектроскопии и метода спектроскопии оптического эффекта Керра, индуцированного комбинационным резонансом (RIKES).

В разделе 1.2 обсуждены строение и функции белков. Показано, что белки с точки зрения структуры являются многоуровневыми системами, при этом состояние белковой молекулы на каждом из уровней определяется всеми предыдущими. Важную роль в

формировании структуры белковой молекулы и в ее функционировании играет взаимодействие молекул белка с молекулами растворителя.

В этом же разделе обсуждаются основы ферментативных реакций. Для изучения динамических характеристик структуры большинства ферментов и исследования взаимосвязи структура-функция с использованием метода вспышки необходимо применение светочувствительного субстрата-регулятора. Отмечено, что на сегодняшний день метод подготовки светочувствительного субстрата-регулятора в необходимой форме для реализации светоиндуцируемой ферментативной реакции не охарактеризован.

В разделе 1.3 обсуждается применение различных методов спектроскопии при исследовании биомолекул, в частности, обсуждается возможность изучения структуры биополимеров с использованием КР спектроскопии. Показано, что лазерная КР спектроскопия является мощным инструментом для определения вторичной структуры биополимеров. Замечено, что при исследовании водных растворов биополимеров возникает проблема наличия интенсивного широкополосного фона, природа которого не до конца ясна.

В этом же разделе обсуждается проблема низкочастотных колебаний в белках. Колебания субглобул белка друг относительно друга могут играть важную роль в его функционировании. Оценки показывают, что частота этих колебаний лежит в области низких частот ($< 100 \text{ см}^{-1}$). Наблюдение данных колебаний в водных растворах белков затруднено. Многими исследователями делается вывод о демпфировании этих колебаний водным окружением. В то же время, теоретические оценки этого явления дают неоднозначные результаты. Поэтому вопрос влияния растворителя на низкочастотные колебательные резонансы является весьма актуальным.

В заключение на основании анализа литературы делается вывод об актуальности настоящего диссертационного исследования.

Вторая глава посвящена описанию экспериментальных установок, использованных в работе, особенностей получения и первичной обработки экспериментальных данных, а также описанию особенностей получения и приготовления образцов. Изложены основы примененных в работе методов вычитания фоновых сигналов из КР спектров, преобразования НЧ КР спектров, а также метода сравнения КР спектров и спектров поглощения.

В работе использовалось шесть различных лазерных источников, параметры которых приведены в диссертационной работе.

Третья глава является оригинальной и посвящена результатам собственных исследований. В ней обсуждаются особенности широкополосного фона в КР спектрах биомолекул. Показано, что начальные интенсивности широкополосного фона в КР спектрах растворов белка и белкового комплекса различаются во столько же раз, во сколько молекулярная масса белка и белкового комплекса (Рис.1). При этом изменение вторичной структуры модельного полипептида поли(L-лизина) влияет как на начальную интенсивность широкополосного фона, так и на временные характеристики кинетик фотообесцвечивания (Рис. 2). В то же время различия характеристик широкополосного фона в КР спектрах нативного и денатурированного белка-фермента лежат в пределах ошибки эксперимента.

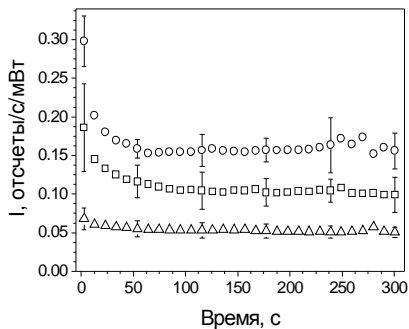


Рис. 1. Кинетики фотообесцвечивания барназы (квадраты), комплекса барназа-барстар (кружки) и растворителя (треугольники). Мощность возбуждения 500 мВт, время накопления сигнала в одной точке 5 с, концентрации барназы и комплекса равны 25 мкМ.

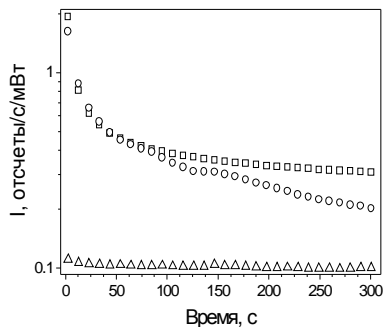


Рис. 2. Кинетики фотообесцвечивания водных растворов поли(L-лизина) при pH 6,5 (квадраты) и pH 13,0 (кружки) и водного раствора NaOH (треугольники). Мощность возбуждения 500 мВт, время накопления сигнала в одной точке 5 с, концентрация 30 мг/мл. Размер символов соответствует экспериментальной ошибке.

На основании этих результатов сделан вывод о том, что при отсутствии флуоресцирующих примесей и флуоресценции растворителя широкополосный фон в КР спектрах водных растворов белков является сигналом от молекул белка. Следовательно,

наличие эффекта фотообесцвечивания растворов биополимеров свидетельствует о деструктивном воздействии видимого лазерного излучения на биомолекулы. При этом колебательные спектры растворов поли(L-лизина) и α -химотрипсина не изменяются во время облучения образцов видимым лазерным излучением, что свидетельствует о неизменности первичной и вторичной структуры исследованных биополимеров во время облучения видимым лазерным излучением.

В последнем разделе данной главы представлены результаты изучения параметров светорассеяния в растворах лазерных красителей. Показано, что при определенных экспериментальных параметрах регистрируемая интенсивность светорассеяния в растворах лазерных красителей может осциллировать. При этом период и амплитуда осцилляций интенсивности светорассеяния растворов красителей зависят от растворителя, мощности лазерного излучения, геометрии заведения излучения в кювету и граничных условий и определяются осцилляциями тепловой линзы. Поэтому осцилляции интенсивности широкополосного фона в КР спектрах растворов биомолекул могут возникать вследствие осцилляций тепловой линзы, которые в свою очередь определяются процессами тепло- и массопереноса в образце.

Таким образом, широкополосный фон в КР спектрах белков является сигналом от белковых молекул, а его характеристики зависят от конформационного состояния белков, поэтому изучение этих характеристик может быть альтернативным методом получения информации о конформационном состоянии белков. Отмечено, что при исследовании биомолекул с использованием лазерного излучения видимого диапазона длин волн необходимо учитывать возможное деструктивное воздействие лазерного излучения. Дальнейшее изучение широкополосного фона в КР спектрах растворов биомолекул может открыть новые аспекты взаимодействия видимого лазерного излучения с этими молекулами.

Четвертая глава также является оригинальной и посвящена обсуждению экспериментальных результатов по изучению НЧ колебательных спектров раствора белка методом RIKES и определению методом лазерной КР спектроскопии влияния растворителей на низкочастотные колебательные резонансы.

Методом RIKES получены спектры воды и водного раствора белка в диапазоне от -4 до 4 см^{-1} . В узкой части крыла Рэлея спектр водного раствора белка шире спектра воды

на 12%, что свидетельствует об уменьшении времени ориентационной релаксации крупных молекулярных образований. В спектре водного раствора белка по сравнению со спектром воды появляется линия в районе 3 см^{-1} . Положение данной линии соответствует проведенным оценкам для субглобулярных колебаний исследуемого белка.

Для смесей модельных веществ тетрахлорэтана (ТХЭ) и тетрабромэтана (ТБЭ) с растворителями диметилсульфоксидом (ДМСО) и четыреххлористым углеродом (ЧХУ) измерены серии КР спектров в зависимости от мольных соотношений компонентов. На основании изменений в КР спектрах смесей в диапазонах С-Н валентных и изгибных колебаний сделан вывод о формировании в смесях с ДМСО комплексов посредством водородных связей. В смесях с ЧХУ подобных комплексов не образуется.

На основании изменений в КР спектрах смесей модельных веществ в диапазоне $40\text{-}400 \text{ см}^{-1}$ сделан вывод о том, что в результате взаимодействия ТХЭ и ТБЭ с ЧХУ происходит смещение динамического равновесия между транс- и гош-изомерами молекул ТХЭ и ТБЭ в сторону транс-конформации, тогда как в результате взаимодействия с ДМСО происходит смещение динамического равновесия в сторону гош-конформации.

Для выявления изменений в параметрах НЧ линий в КР спектрах модельных веществ проведено сравнение спектров смесей со спектрами чистых веществ. Показано, что в результате влияния ДМСО и ЧХУ на молекулы ТБЭ и ТХЭ происходит сдвиг до 4 см^{-1} НЧ линии, соответствующей торсионному колебанию относительно С-С связи, в спектрах смесей ТБЭ (64 см^{-1}) и смесей ТХЭ (94 см^{-1}) (Рис. 3).

В смеси ТБЭ с ДМСО выявлено уширение НЧ линии, соответствующей торсионному колебанию относительно С-С связи

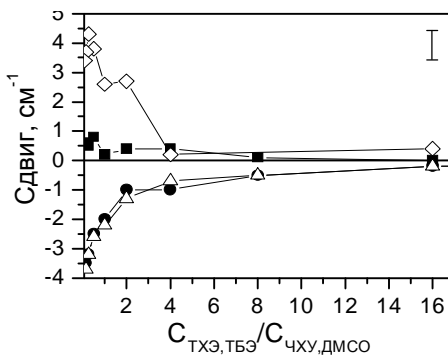


Рис. 3. Зависимости сдвигов низкочастотных линий в КР спектрах ТХЭ (94 см^{-1}) в смесях с ЧХУ (\square) и с ДМСО (\blacksquare), ТБЭ (64 см^{-1}) в смесях с ЧХУ (\blacktriangle) и с ДМСО (\blacklozenge) от мольного соотношения компонентов смеси.

(64 см^{-1}), на 30%. Данное изменение может быть объяснено либо изменением добротности торсионного колебания, то есть изменением эффективного трения в среде под влиянием растворителя, либо, если данная линия состоит из нескольких компонентов, изменением относительной интенсивности и положения компонентов под влиянием растворителя.

Были измерены КР спектры водных растворов ацетамида при различных мольных соотношениях ацетамида и воды.

Выявлено, что НЧ линия в КР спектре ацетамида состоит из нескольких компонентов. Показано, что под влиянием воды в КР спектрах водных растворов ацетамида происходит изменение формы НЧ линии, причем изменение формы вызвано изменением относительной интенсивности компонентов линии (рис. 4). Так, интенсивность самого низкочастотного компонента изменяется в строгом соответствии с концентрацией, тогда как относительная интенсивность более высокочастотных компонентов возрастает с уменьшением концентрации ацетамида в воде.

Далее проведены теоретические оценки влияния растворителя на НЧ колебательные резонансы модельного вещества. Результаты теоретических расчетов показывают, что уширение НЧ линий не может быть объяснено ангармонизмом соответствующего потенциала, а влияние растворителя на НЧ колебания должно проявляться в сдвиге соответствующих линий в спектре.

Таким образом, в четвертой главе показано, что влияние растворителей на низкочастотные колебательные резонансы модельных веществ, выражается в сдвиге, уширении и изменении формы линии. Наблюдаемые изменения не могут быть объяснены

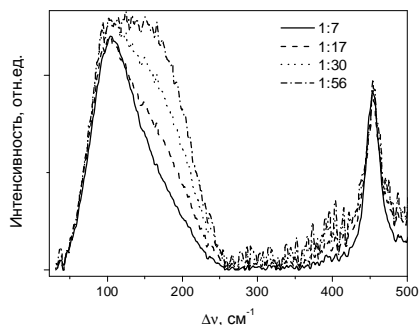


Рис. 4. Серия нормированных на молярную концентрацию КР спектров растворов ацетамида в воде в R(v)-представлении при разных мольных соотношениях ацетамида и воды (указаны на рисунке). Для наглядности из спектров вычтен фон методом анализирующей окружности.

только изменением эффективного трения в присутствии молекул растворителя. Наблюдаемые уширения НЧ линий в КР спектрах модельных веществ могут быть объяснены изменением под влиянием растворителя относительной интенсивности компонентов этих линий.

Пятая глава также является оригинальной и посвящена характеристике метода лазерной подготовки светочувствительного субстрата-регулятора светоиндуцируемой ферментативной реакции, а также обсуждению возможности исследования светоиндуцируемой ферментативной реакции методом лазерной КР спектроскопии.

Получены 4 серии спектров поглощения растворов субстрата-регулятора в зависимости от дозы лазерного облучения на четырех длинах волн: 266, 308, 325, 355 нм.

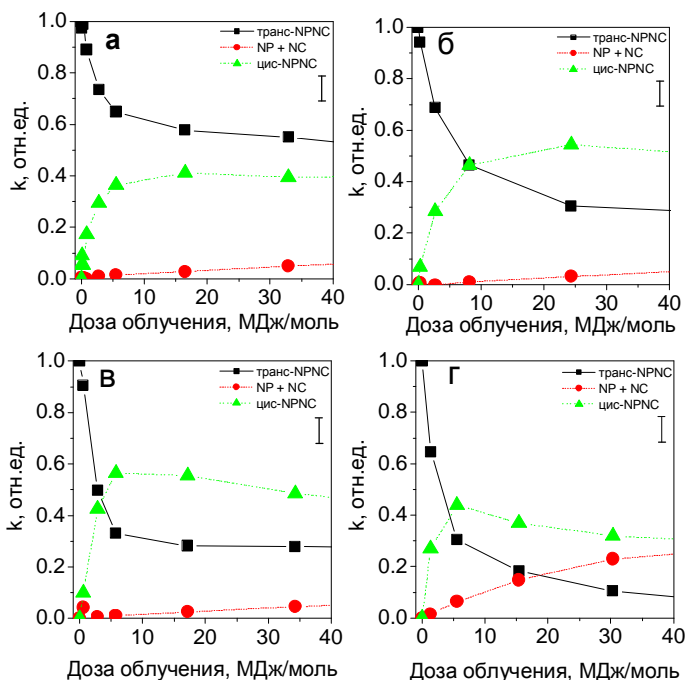


Рис. 5. Зависимости концентраций компонентов раствора субстрата-регулятора светоиндуцируемой ферментативной реакции от дозы лазерного облучения на длине волны 266 нм (а), 308 нм (б), 325 нм (в) и 355 нм (г). Субстратом-регулятором является пара-нитрофениловый эфир пара-транс(цис)-нитрокоричной кислоты (транс(цис)-NPNC), продукты фотогидролиза: п-нитрофенол (NP), пара-нитрокоричная кислота (NC). Концентрации рассчитаны относительно начальной концентрации транс-NPNC

На основании этих спектров сделан вывод о возможном протекании побочной реакции при облучении. С помощью методов ЯМР-спектроскопии и жидкостной хроматографии произведена идентификация компонентов раствора, появляющихся в результате облучения. Показано, что в результате облучения субстрата-регулятора лазерным излучением происходит транс-цис изомеризация субстрата (преобразование субстрата-регулятора в необходимую для реализации светоиндуцируемой ферментативной реакции форму) и фотогидролиз субстрата. На основании полученных результатов разработана методика контроля состава раствора субстрата и определения концентраций компонентов раствора субстрата-регулятора светоиндуцируемой ферментативной реакции по его спектру поглощения.

С использованием предложенного метода контроля состава раствора получены зависимости относительных концентраций компонентов от дозы облучения (рис. 5) лазерным излучением четырех длин волн. Определено, что из четырех использованных в экспериментах длин волн длина волны излучения 325 нм обеспечивает максимальное преобразование субстрата-регулятора в необходимую для реализации светоиндуцируемой ферментативной реакции форму: при дозе облучения 6 МДж/моль 55% исходного субстрата преобразуется в необходимую форму (таблица 1).

Для применения раствора субстрата-регулятора светоиндуцируемой ферментативной реакции наличие в составе продуктов фотогидролиза не является существенным, так как после формирования фермент-субстратного комплекса возможна очистка реакционной смеси.

Таблица 1. Максимальные относительные концентрации цис-NPNC.

Длина волны облучения, нм	266	308	325	355
Отношение максимальной концентрации цис-NPNC к начальной концентрации NPNC	0.40±0.05	0.50±0.05	0.55±0.05	0.45 ±0.05
Доза, необходимая для получения максимальной концентрации цис-NPNC, МДж/моль	16	24	6	6

Измерены КР спектры компонентов модельной системы фермент-субстрат на примере белка-фермента α -химотрипсина и светочувствительного субстрата-регулятора пара-нитрофенилового эфира пара-нитрокоричной кислоты (NPNC), а также растворителей и продуктов фотогидролиза. На основании полученных КР спектров

определено, что использование КР спектроскопии для контроля состава растворов субстрата-регулятора NPNC во время облучения является неоправданным из-за низкой чувствительности КР спектроскопии к наличию продуктов распада.

В КР спектре фермента, находящегося в составе фермент-субстратного комплекса, выявлены спектральные диапазоны, не перекрывающиеся резонансами растворителей или субстрата и соответствующие конформационно-чувствительным полосам фермента. Это диапазон $650-700\text{ см}^{-1}$, соответствующий колебаниям C-S групп белка, диапазон тирозинового дублета (835 и 860 см^{-1}), а также диапазон, соответствующий амиду III ($1230-1330\text{ см}^{-1}$).

В КР спектре фермента, находящегося в составе фермент-субстратного комплекса (ацилфермента), выявлены изменения конформационно-чувствительной полосы амид III. Так, линия с центром 1245 см^{-1} , соответствующая колебаниям β -структурных участков фермента и наблюдающаяся в КР спектре несвязанного фермента, в КР спектре ацилфермента практически исчезает. При этом в спектре ацилфермента появляется интенсивная линия с центром 1290 см^{-1} , соответствующая, по разным данным, колебаниям α -спиральных или неупорядоченных участков белковой молекулы. Следовательно, в результате формирования фермент-субстратного комплекса во вторичной структуре фермента происходят значительные изменения.

Таким образом, в пятой главе охарактеризован метод управления субстратом-регулятором светоиндуцируемой ферментативной реакции. Этот метод может быть применён в экспериментах по изучению функционирования фермента α -химотрипсина. Показано, что КР спектроскопия может быть использована в качестве метода определения структурных изменений в системе фермент-субстрат при фотоуправлении ферментативной реакцией.

В разделе **Заключение** сформулированы основные результаты и выводы диссертационной работы:

1. Интенсивность широкополосного фона в КР спектрах водных растворов белков и характерное время фотообесцвечивания при отсутствии флуоресцирующих примесей и флуоресценции растворителя зависят от конформационного состояния белка.

2. Наличие эффекта фотообесцвечивания растворов биополимеров свидетельствует о деструктивном воздействии видимого лазерного излучения на биомолекулы. При этом видимое лазерное излучение не оказывает влияния на аминокислотный состав и не вызывает существенных изменений во вторичной структуре биополимеров.
3. Осцилляции интенсивности широкополосного фона в КР спектрах растворов биомолекул могут возникать вследствие осцилляций тепловой линзы, которые в свою очередь определяются процессами тепло- и массопереноса в образце.
4. С использованием спектроскопии оптического эффекта Керра, индуцированного комбинационным резонансом, получены спектры водного раствора белка в диапазоне от -4 до 4 см^{-1} .
5. Влияние растворителей на низкочастотные колебательные резонансы модельных веществ выражается в сдвиге, уширении и изменении формы линии. Данные изменения не могут быть объяснены только изменением эффективного трения в среде вследствие влияния растворителя.
6. Охарактеризован метод лазерной подготовки субстрата-регулятора NPNC светоиндуцируемой ферментативной реакции, который может быть применён в экспериментах по изучению динамических свойств фермента α -химотрипсина во время его функционирования. Из четырех использованных в эксперименте длин волн лазерного излучения облучение на длине волны 325 нм позволяет достичь максимальной относительной концентрации необходимой формы субстрата-регулятора при дозе облучения 6 МДж/моль .

Список публикаций по теме диссертации

Научные статьи:

1. A.F. Bunkin, A.Yu. Chikishev, A.P. Gorchakov, S.I. Lebedenko, A.A. Nurmatov, S.M. Pershin. Four-photon spectroscopy of α -chymotrypsin protein aqueous solution in subterahertz range from -4 to 4 cm^{-1} // Physics of Wave Phenomena, 2004, v. 12, № 4, p. 175–179.
2. N. R. Arutyunyan, N. N. Brandt, A. Yu. Chikishev, S. I. Lebedenko, and Yu.M. Romanovsky. Nature of the Broadband Background in Raman Spectra of Aqueous Solutions of α -Chymotrypsin // Laser Physics, 2004, v. 14, № 8, p. 1054.

3. N. N. Brandt, A. Yu. Chikishev, A. I. Chulichkov, P. A. Ignatiev, S. I. Lebedenko, and O. V. Voronina. A Method of Comparing Raman Spectra // *Laser Physics*, 2004, v. 14, № 11, p. 1386.
4. А.Ф. Бункин, С.И. Лебеде́нко, А.А. Нурматов, А.Ю. Чикишев, С.М. Першин. Четырехфотонная спектроскопия водного раствора α -химотрипсина в терагерцовом диапазоне от 10 до -100 см^{-1} // *Оптика и Спектроскопия*, 2005, т. 99, № 4, с. 601-605.
5. N.R. Arutyunyan, N.N. Brandt, A.Yu. Chikishev, S.I. Lebedenko, O.D. Parashchuk and A.D.Razzhivin. Broadband Background in Raman Spectra of Proteins: Deterministic Signal or Noise? // *Fluctuation and Noise Letters*, 2005, v. 5, № 5, p. L233.
6. A.F. Bunkin, A.A. Nurmatov, S.M. Pershin, S.I. Lebedenko. Low-Frequency Four-Photon Spectroscopy Of Tetrachloroethane And Tetrabromoethane Molecule Rotations In Liquid Phase // *Physics of Wave Phenomena*, 2006, v. 14, № 2, p. 87-91.
7. А.Ф. Бункин, С.И. Лебеде́нко, А.А. Нурматов, С.М. Першин. Четырехфотонная спектроскопия крыла Рэля водного раствора белка α -химотрипсина // *Квантовая электроника*, 2006, т. 36, №7, с. 612-615.
8. N. N. Brandt, A. Yu. Chikishev, V. I. Dolgovskii, and S. I. Lebedenko. Laser Raman Spectroscopy of the Effect of Solvent on the Low-Frequency Oscillations of Organic Molecules // *Laser Physics*, 2007, v. 17, № 9, p. 1133–1137.
9. N. N. Brandt, O. O. Brovko, A. Yu. Chikishev, K. Itoh, S. I. Lebedenko, V.I. Polshakov, and I. K. Sakodinskaya. Laser Control of the Structure of a Photosensitive Substrate for Enzymatic Reaction // *Laser Physics*, 2007, v. 17, № 9, p. 1154–1157.

Тезисы докладов:

1. N.N. Brandt, A.Yu. Chikishev, S.I. Lebedenko. Simulation of Protein Solution Photobleaching Kinetics. // *Book of abstracts, ABC, Thailand*, 3-7 February, 2003, p. 64.
2. N.N. Brandt, A.Yu. Chikishev, S.I. Lebedenko. Laser Scattering Spectroscopy As Means to Measure Thermodiffusion of Proteins. // *Book of abstracts, ECSBM, Hungary*, 30 August – 4 September, 2003, p. 48.
3. N.N. Brandt, A.Yu. Chikishev, S.I. Lebedenko. Laser Raman Spectroscopy of Proteins: Problem of the Broadband Background. // *Book of abstracts, ITARUS, Russia*, 29 October – 2 November, 2003.
4. Н.Н. Брандт, С.И. Лебеде́нко, А.Ю. Чикишев. Модели фотообесцвечивания растворов биомолекул // *Сборник тезисов, Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых “Ломоносов-2003”*, Россия, Москва, 2003.
5. N.R. Arutyunyan, N.N. Brandt, A.Yu. Chikishev, S.I. Lebedenko, O.D. Parashchuk. Broadband background in Raman spectra of proteins: deterministic signal or noise? // *Book of abstracts, International Workshop on Noise in Condensed Matter and Complex Systems, Italy*, 26-29 July, 2004, p. 14.
6. A.F.Bunkin, A.P.Gorchakov, A.A.Nurmatov, S.M.Pershin, A.Yu. Chikishev, S.I. Lebedenko. Four-photon Rayleigh wing spectroscopy of water and the aqueous solution of protein // *Book of Abstracts, ICONO, Russia*, 11-15 May, 2005, p. 106.
7. N.N.Brandt, A.Yu Chikishev, S.I.Lebedenko, I.K.Sakodinskaya. Laser induced trans-cis transformation of p-nitrophenyl ester of trans-4-nitrocinnamic acid. // *Book of abstracts, European Congress on molecular spectroscopy, Turkey*, 3-8 September, 2006, p.289.

8. N.N. Brandt, A.Yu. Chikishev, V.I. Dolgovskii, S.I. Lebedenko. Low-frequency Raman spectroscopy of macromolecules // Book of Abstracts, Workshop on Biophotonics and Molecular Simulations, Slovakia, 9-12 September, 2006, p. S2-B3.
9. N.N. Brandt, O.O. Brovko, A.Yu. Chikishev, S.I. Lebedenko, I.K. Sakodinskaya, V.I. Polshakov. Laser activation of photosensitive substrate for enzymatic reaction with chymotrypsin. // Book of Abstracts, ICONO, Belarus, 28 May -1 June, 2007.
10. N.N. Brandt, O.O. Brovko, A.Yu. Chikishev, S.I. Lebedenko, I.K. Sakodinskaya, V.I. Polshakov. Laser control of enzymatic reaction: Raman and absorption spectroscopy. // Book of Abstracts, LALS, Russia, 11-14 June, 2007.
11. N.N. Brandt, A.Yu. Chikishev, V.I. Dolgovskii, S.I. Lebedenko. Effect of Solvent on the Low-Frequency Vibrational Resonances in Raman Spectra of Organic Molecules // Book of Abstracts, LALS, Russia, 11-14 June, 2007.
12. N.N. Brandt, A.Yu. Chikishev, V.I. Dolgovskii, A.V. Kargovskii, S.I. Lebedenko. Low-frequency Vibrational motions in proteins: physical mechanisms and effect on functioning // Book of Abstracts. International Workshop on Ecological Complex Systems: Stochastic Dynamics and Patterns. Italy, Palermo, 2007, p. 12.