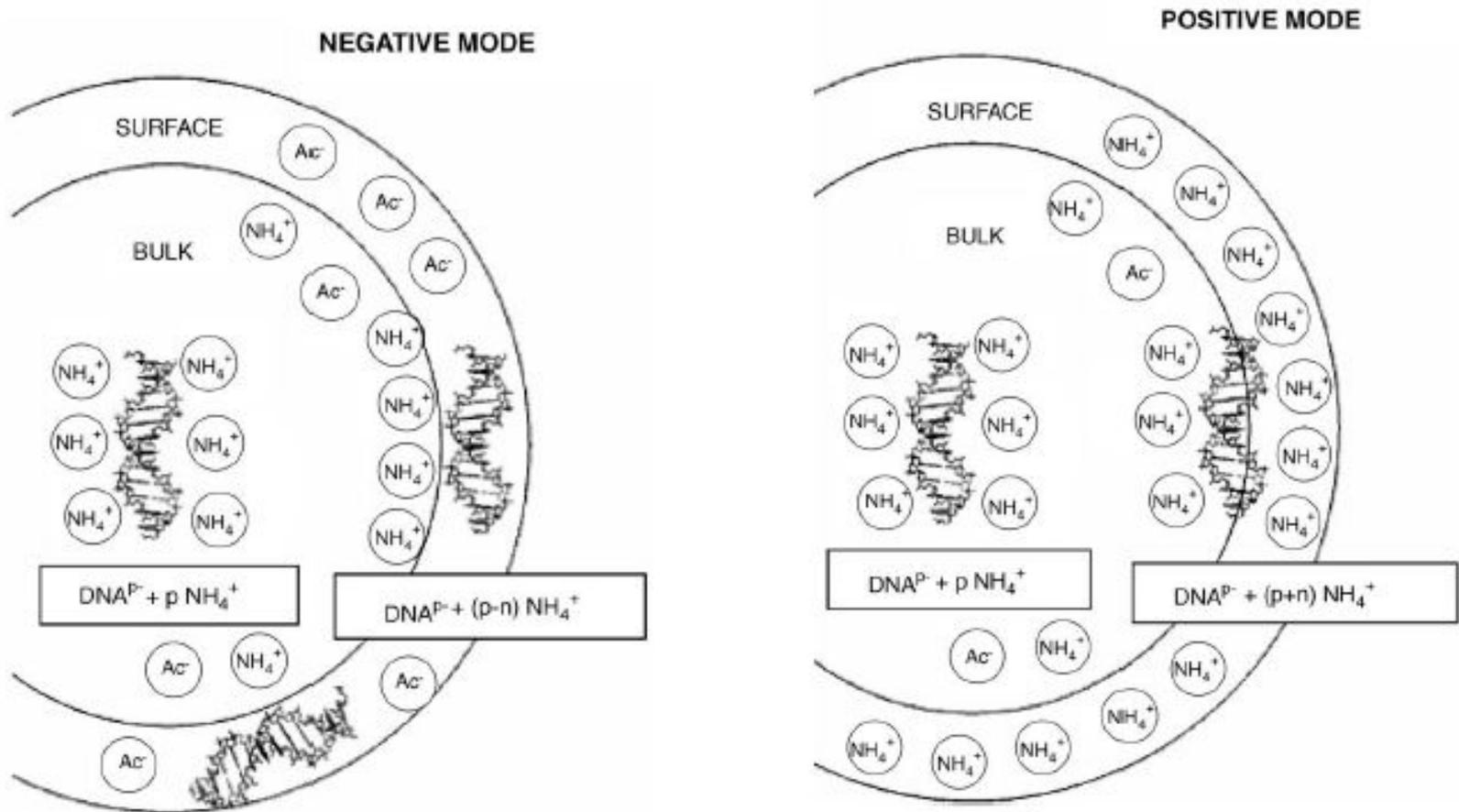


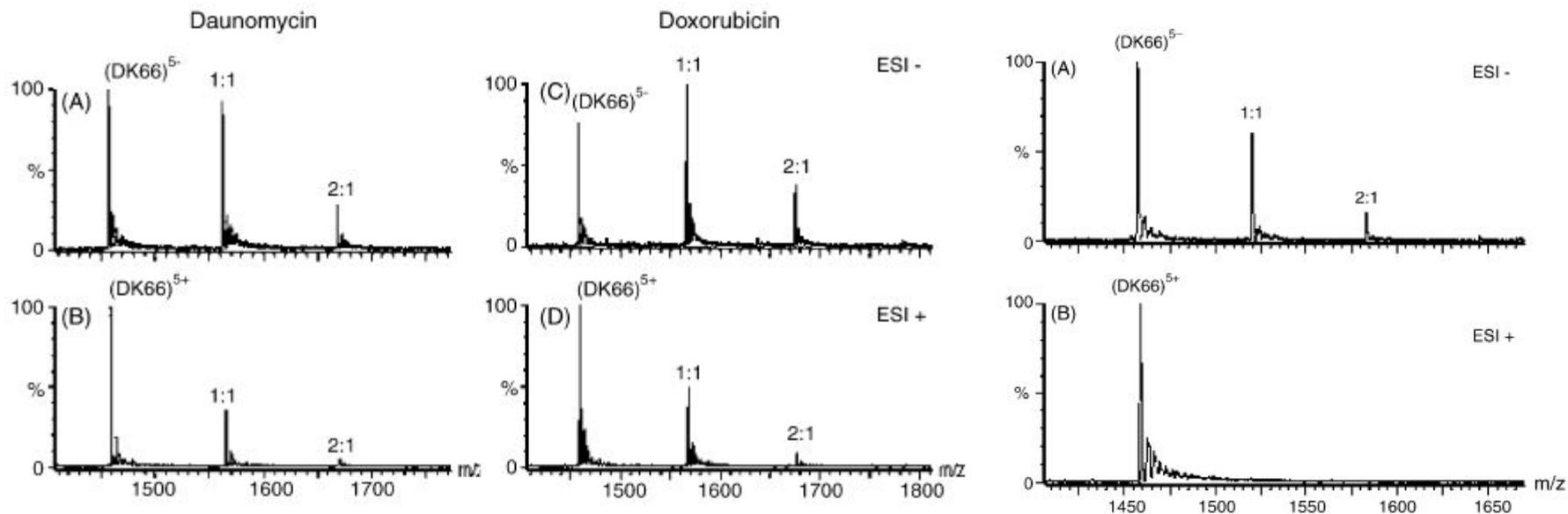
ЛЕЦИЯ №2

- Методы исследования комплексообразования:
 - 1) масс-спектрометрия
 - 2) плазмонный резонанс
 - 3) Спектральные методы
 - а) электронные спектры поглощения
 - б) линейный дихроизм
 - в) круговой дихроизм
 - г) флуоресценция
 - 4) рентгено-структурный анализ

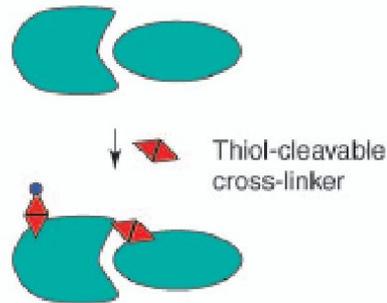
Схематическое представление процесса образования заряженных капель раствора ДНК в ацетате аммония (отрицательная и положительная моды)



Полные спектры ESI-MS дуплекса d(CGCGAATTCGCG)₂ с дауномицином, доксорубицином и бромистым этидием в отрицательной (верх) и положительной (низ) моде



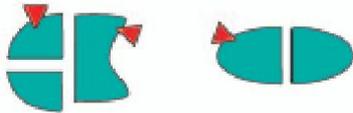
Масс-спектрометрический анализ



Protease

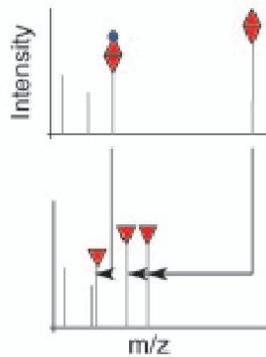


Thiol reagent

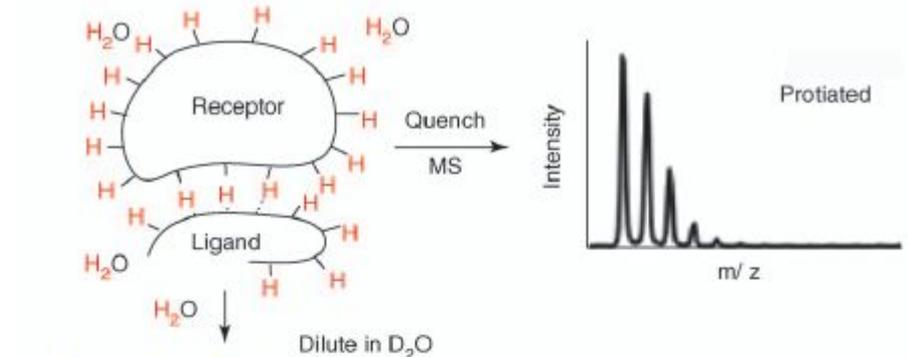


Partially hydrolyzed cross-linker: probes the solvent-accessible surface

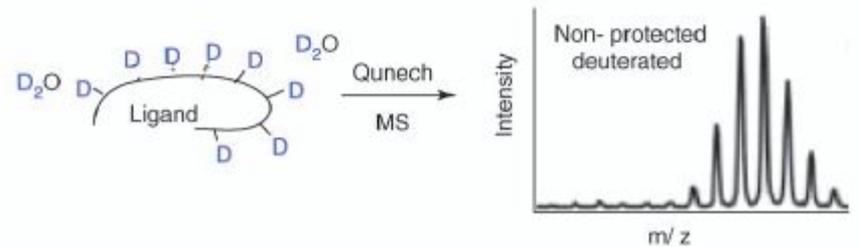
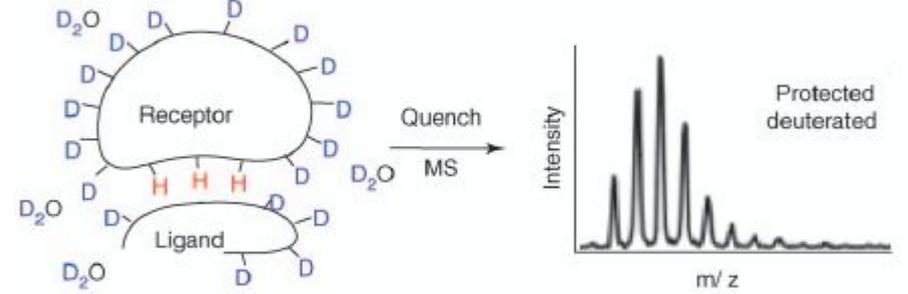
Intermolecular cross-link: probes the boundary of the interaction area



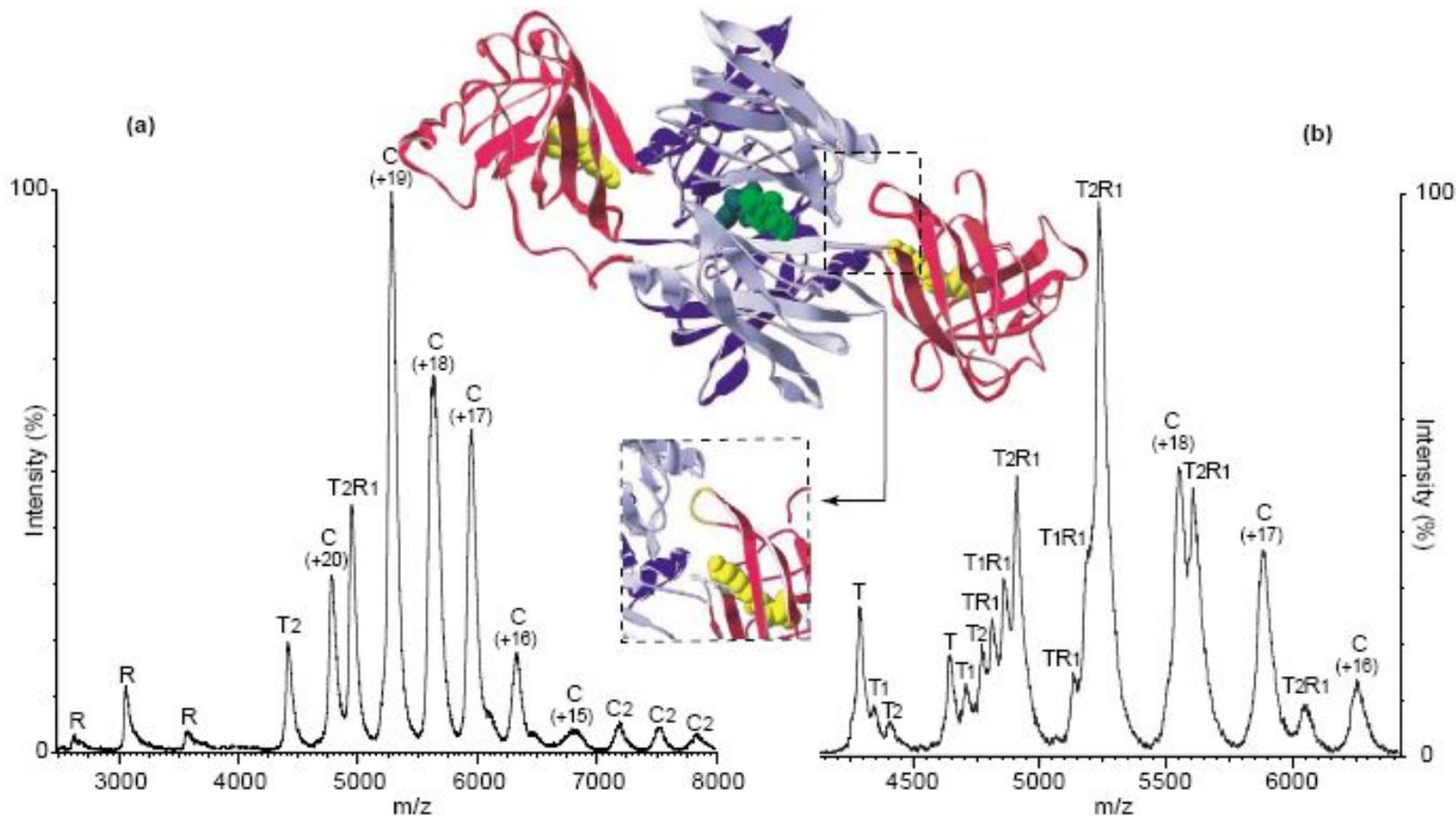
Reduced cross-linker



Dilute in D₂O

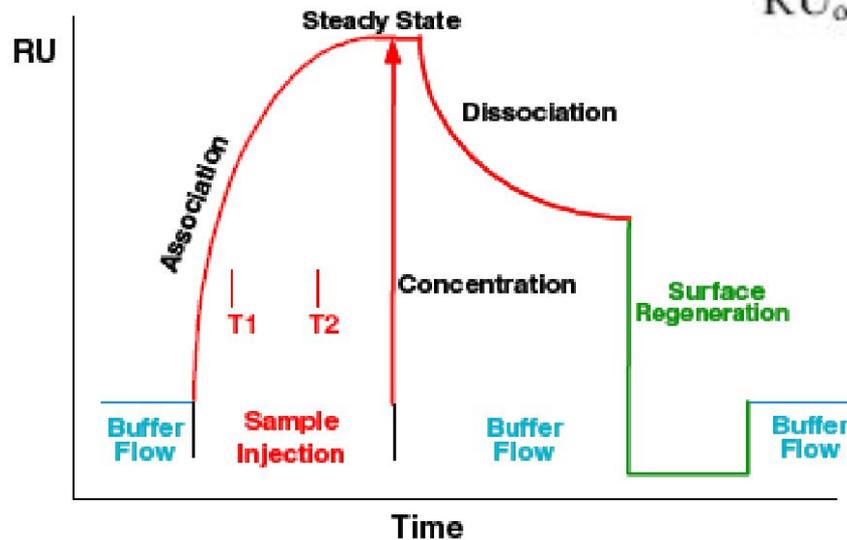
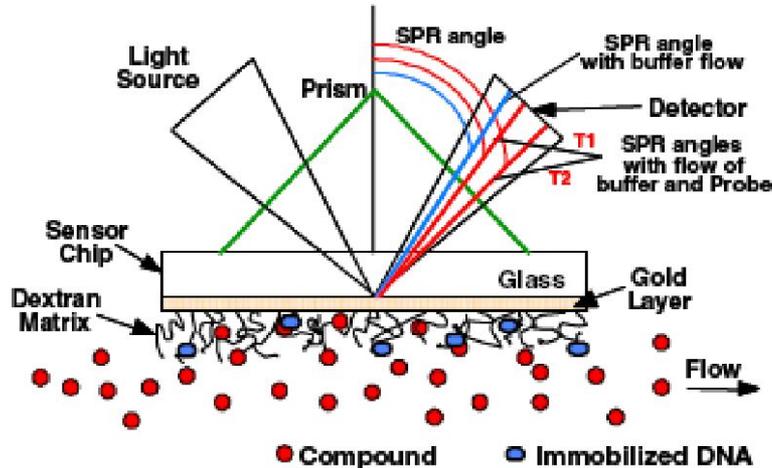


Образование 10-компонентного белкового комплекса с кофакторами и лигандами (а)



Диссоциация мультипротеинового комплекса (b)

Плазмонный резонанс



$$RU_{\text{obs}} = r \times RU_{\text{D}} \times (M_{\text{L}}/M_{\text{D}}) \times [(dn/dc)_{\text{L}}/(dn/dc)_{\text{D}}],$$

RU_{D} : amount of immobilized DNA

M_{L} : molecular weight of ligand

M_{D} : molecular weight of DNA

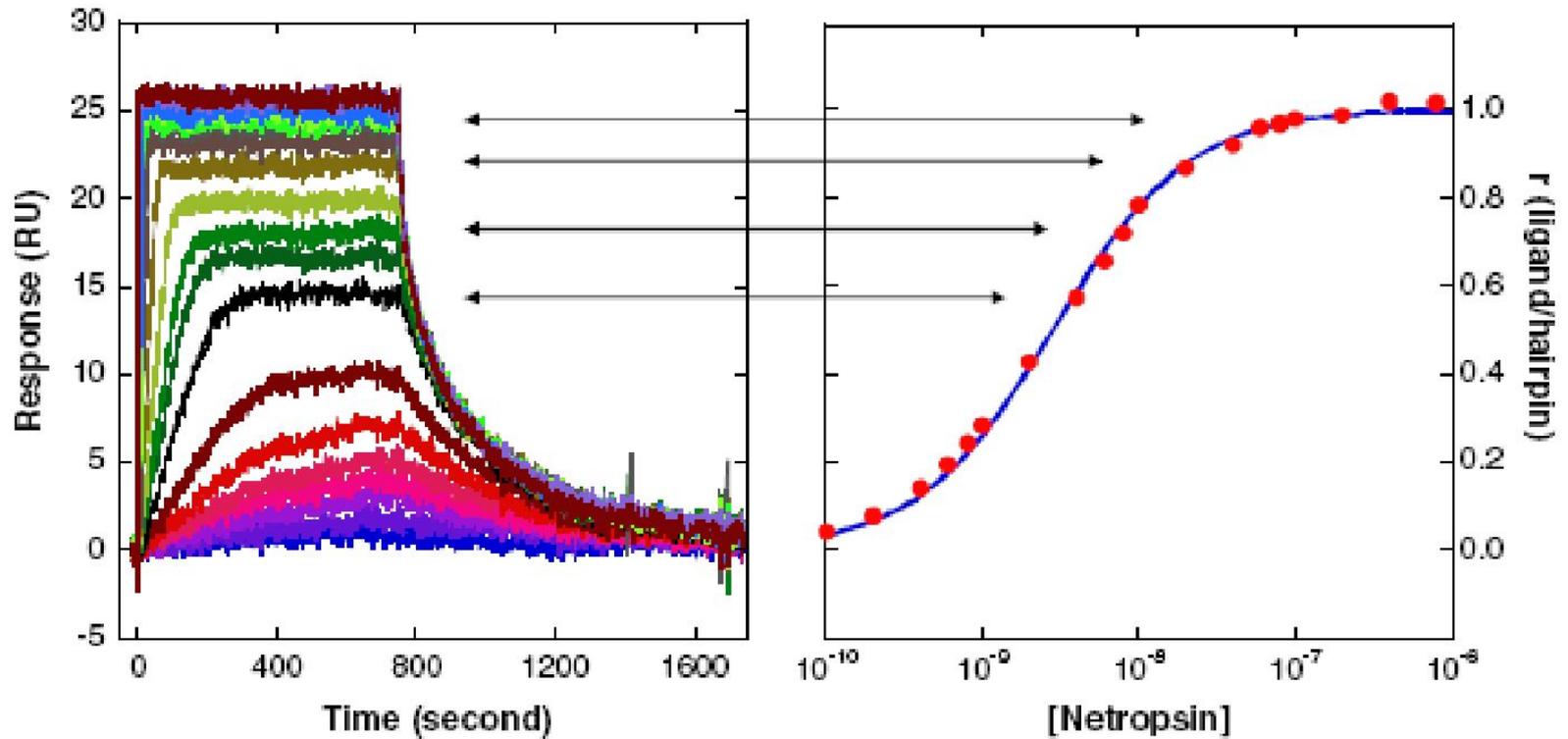
$(dn/dc)_{\text{L}}/(dn/dc)_{\text{D}}$: refractive index increment ratio

r = moles bound ligand/moles DNA or

$r = RU_{\text{obs}}/RU_{\text{pred-max}}$.

$$RU_{\text{obs}}/RU_{\text{pred-max}} = r = (K \times L_{\text{free}})/(1 + K \times L_{\text{free}}).$$

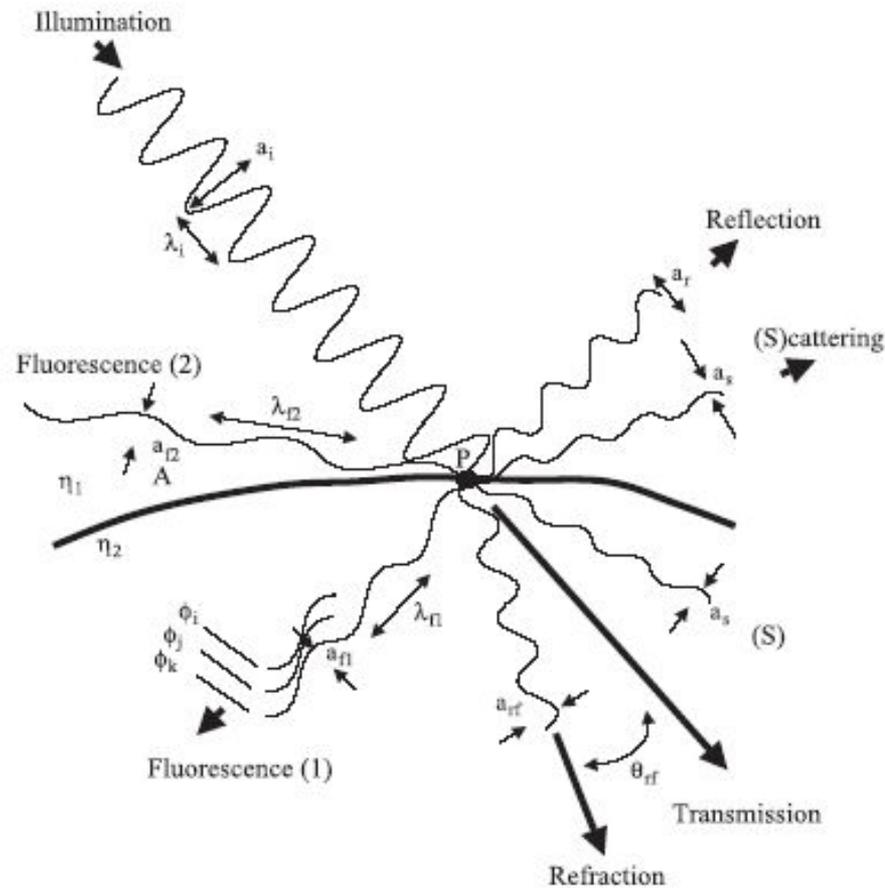
Сенсограмма



Fluorescence techniques for drug delivery research: theory and practice

Nick S. White^{a,*}, Rachel J. Errington^b

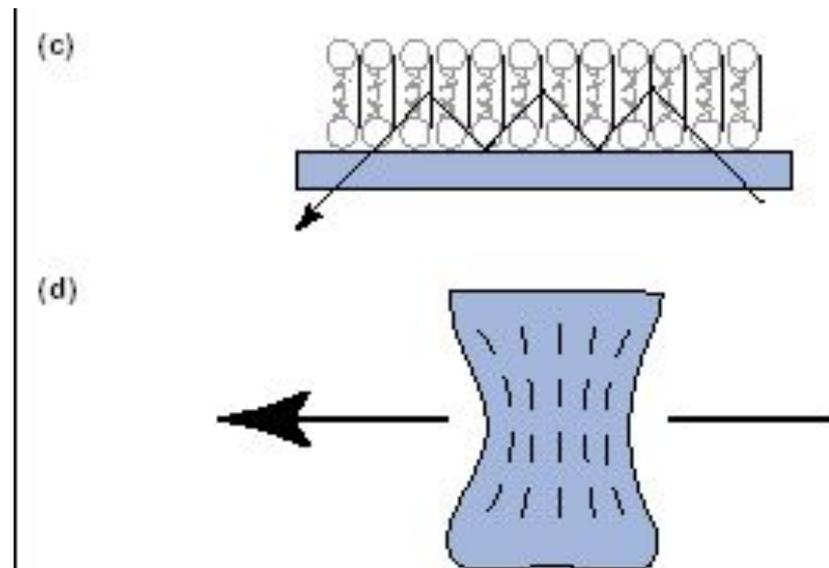
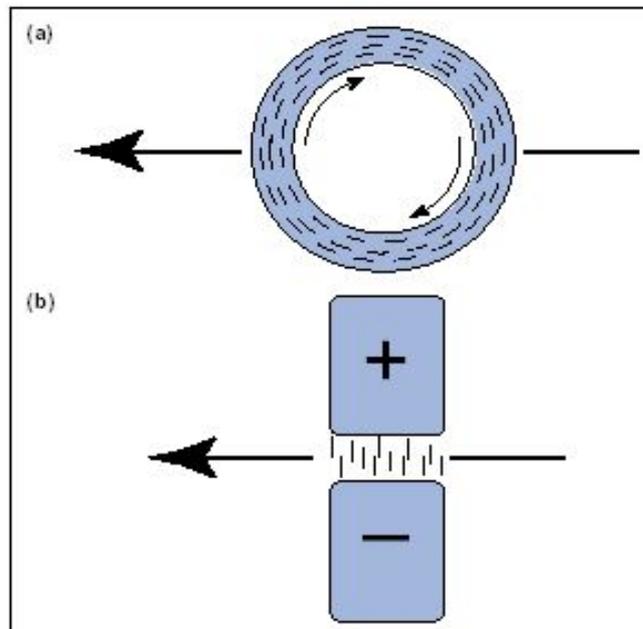
Advanced Drug Delivery Reviews 57 (2005) 17–42



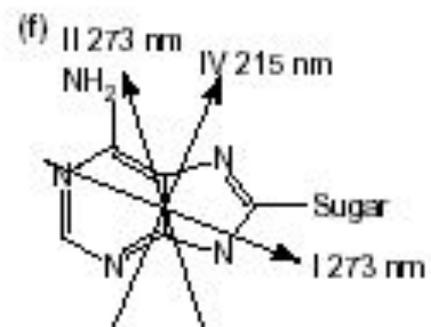
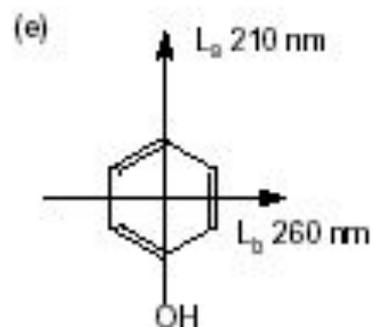
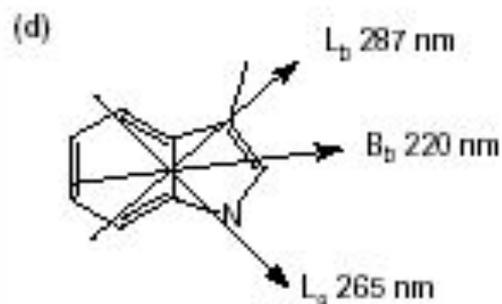
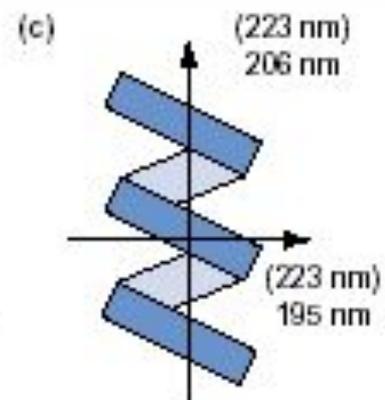
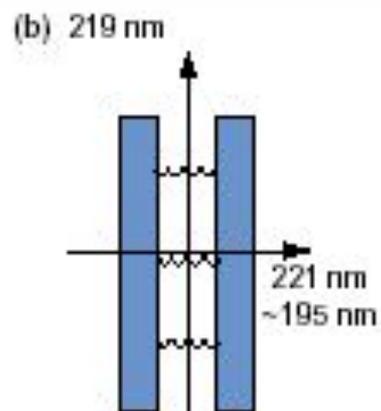
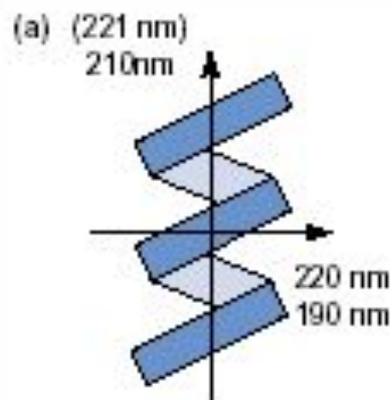
Linear dichroism of biomolecules: which way is up?

Timothy R Dafforn¹ and Alison Rodger²

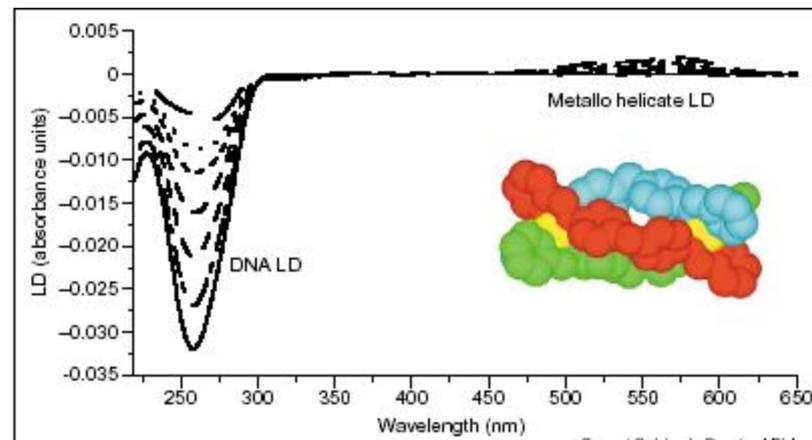
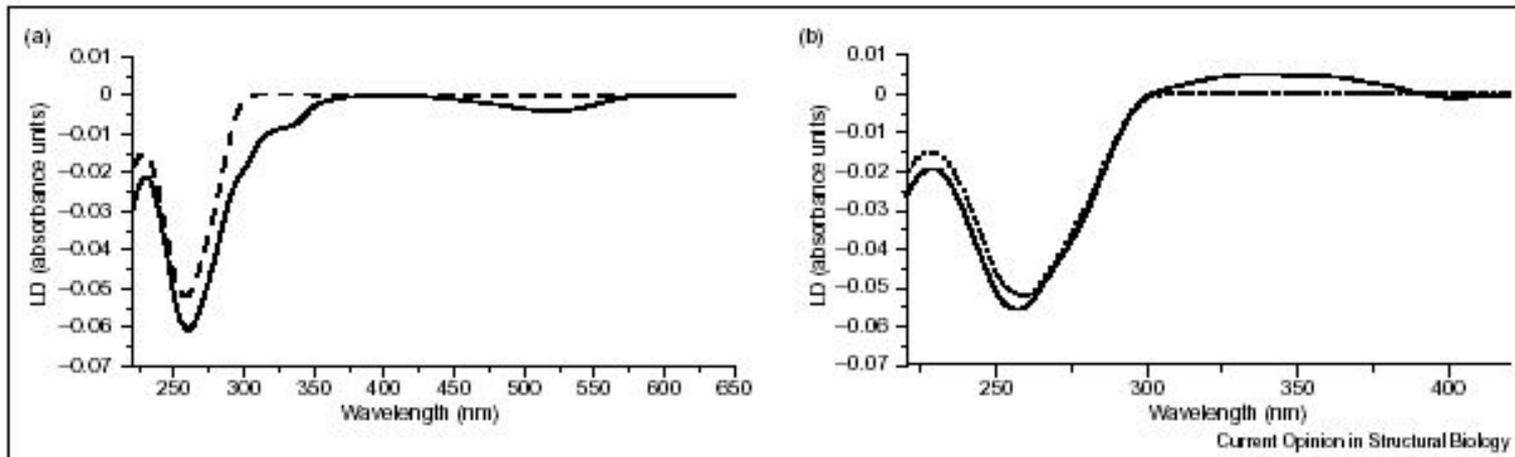
Current Opinion in Structural Biology 2004, 14:541–546



Current Opinion in Structural Biology



Current Opinion in Structural Biology



Метод кругового дихроизма

Вращательная сила электронного перехода

$$R_{\omega} = \text{Im}(\boldsymbol{\mu}_{\omega} \cdot \mathbf{m}_{\omega})$$

$$\boldsymbol{\mu}_{\omega} = \int \Psi_a^* \boldsymbol{\mu} \Psi_b d\tau = e \int \Psi_a^* (\sum_i \mathbf{r}_i) \Psi_b d\tau$$

$$\mathbf{m}_{\omega} = \int \Psi_a^* \mathbf{m} \Psi_b d\tau = \frac{e}{2mc} \int \Psi_a^* (\sum_i \mathbf{r}_i \times \mathbf{p}_i) \Psi_b d\tau$$

$$R_{ab} = \text{Im} [|\bar{\boldsymbol{\mu}}_{ab}| |\bar{\mathbf{m}}_{ab}| \cos \theta]$$

Структура и спектры поглощения и КД уридина

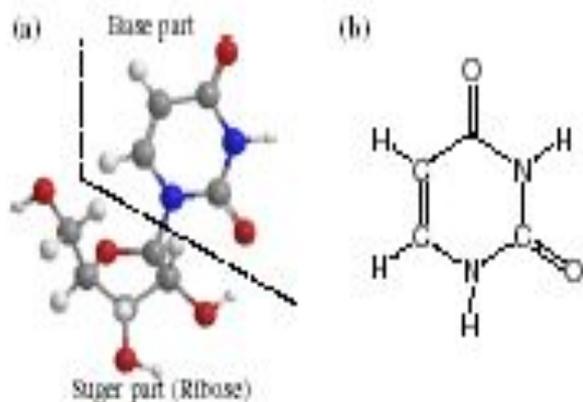


Fig. 1. Structures of: (a) uridine and (b) uracil. The H, C, N, and O atoms are colored by white, grey, blue, and red, respectively. (For interpretation of the references in colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

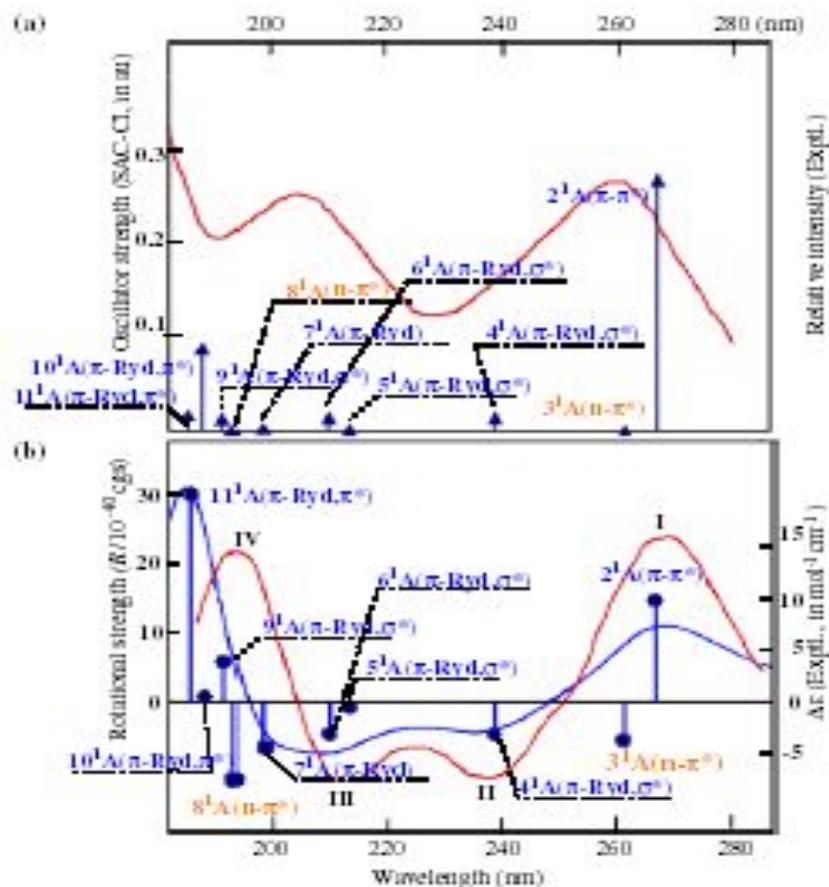


Fig. 2. (a) Absorption and (b) CD spectra of uridine. SAC-CI spectra (shown by blue lines) compared with the experimental spectrum [5] (shown by red lines). (For interpretation of the references in colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Спектр КД димера

- Общее выражение
- Три слагаемых
 - а) собственный КД мономеров (одноэлектронный член)
 - б) магнитно-электрический член
 - в) экситонный член
- Необходимость учитывать дополнительные слагаемые в первом члене (возмущение, вносимое полем димера) и в остальных членах (взаимодействие с другими электронными переходами мономера)

Экситонный спектр КД

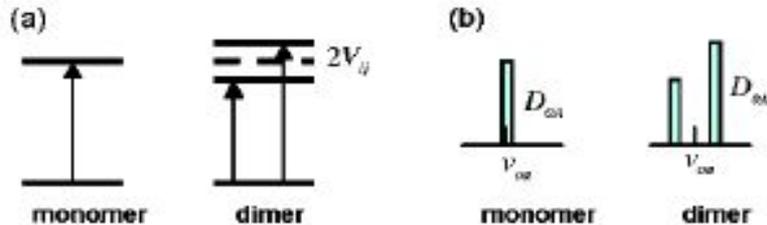


Figure 7. (a) Energy levels for a monomer and dimer, showing the exciton splitting $2V_{ij}$, and (b) spectra of a monomer and dimer, showing band intensities D_{0A} (after ref 23).

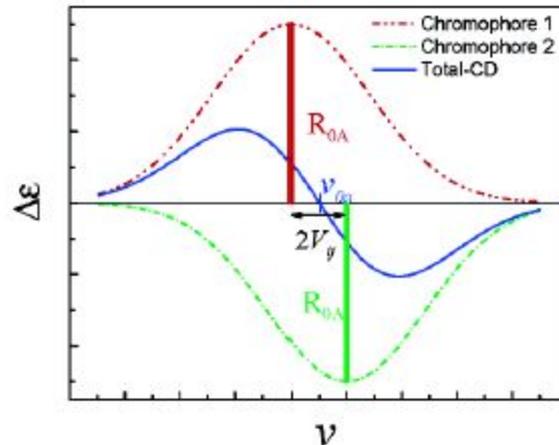


Figure 10. CD spectra of a dimer with identical chromophores. Dashed lines show the contributions to the spectra from the two exciton split bands and the solid line shows the expected observed spectrum (after ref 23).

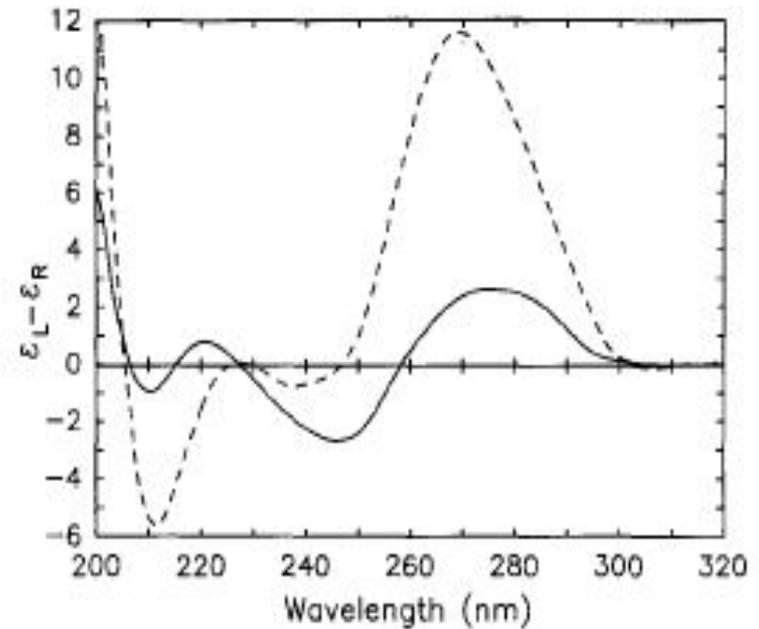
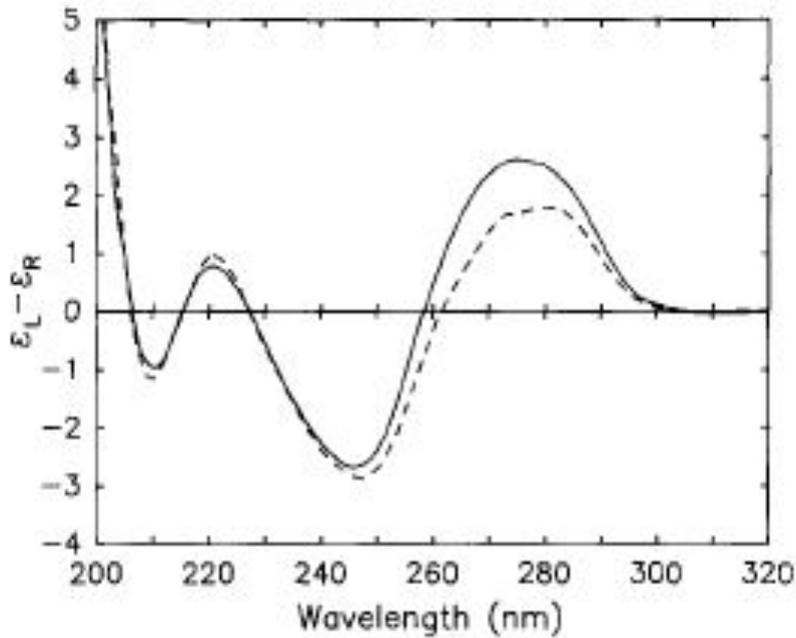
$$R_{0A} = \text{imag}\{\langle \Psi_0 | \hat{\mu} | \Psi_A \rangle \cdot \langle \Psi_A | \hat{m} | \Psi_0 \rangle\}$$

$$R_{0A\pm} \approx \pm \frac{\pi}{2\lambda} \vec{R}_{ij} \cdot \vec{\mu}_j \times \vec{\mu}_i$$

$$\Delta\epsilon \approx \pm \frac{\pi}{2\lambda} \vec{R}_{ij} \cdot \vec{\mu}_i \times \vec{\mu}_j \cdot \vec{V}_{ij}$$

$$\Delta\epsilon \approx \pm \frac{\pi}{4\lambda} \mu_i^2 \mu_j^2 R_{ij}^{-2} \sin(2\theta)$$

Спектры КД ДНК при 0% и 60% спирта (B-форма) и 80% спирта (A-форма)



Индукцированный КД (по Mason, 1971)

- Влияние асимметричного поля ДНК: смешение электрического и магнитного моментов одного перехода (одно-электронный член)
- Конформационная подвижность лиганда
- Вырожденное экситонное взаимодействие между соседними связанными молекулами лиганда
- невырожденное экситонное взаимодействие хромофора лиганда и мономера ДНК
- невырожденное экситонное взаимодействие между соседними связанными молекулами лиганда
- Зависимость от r в каждом случае
- Соотношение со спектром поглощения

Сила вращения разрешенного перехода с большим дипольным моментом, взаимодействующего с хирально расположенным дипольным моментом

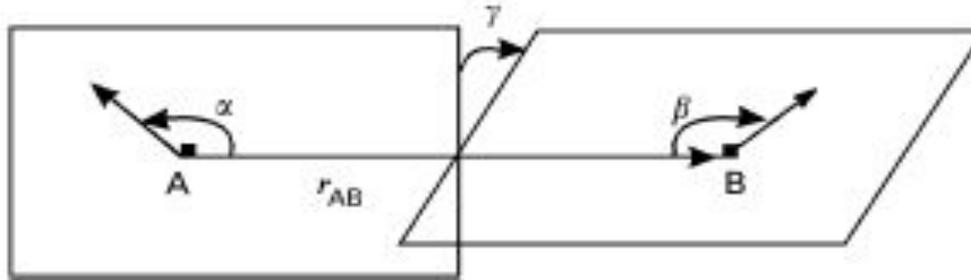


Figure 1 Geometry and coordinates of the A-B system. Transition moments μ_A and μ_B of chromophores A and B and the separation vector R_{BA} .

$$R(A) = \frac{-2\pi\nu_A\nu_B}{hc(\nu_B^2 - \nu_A^2)} V_{BA} O_{BA}$$

$$O_{BA} = R_{BA} \cdot (\mu_A \times \mu_B)$$

$$V_{BA} = \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \frac{1}{|R_{BA}|^3} \left[(\mu_A \cdot \mu_B) - \frac{3}{|R_{BA}|^2} \times (\mu_A \cdot R_{BA})(\mu_B \cdot R_{BA}) \right]$$

$$R(A) = -\frac{2\pi\nu_A\nu_B(\mu_A\mu_B)^2}{hc(\nu_B^2 - \nu_A^2)R_{BA}^2} (\sin\alpha \sin\beta \cos\gamma + 2\cos\alpha \cos\beta) \sin\alpha \sin\beta \sin\gamma$$

Интеркаляционное связывание

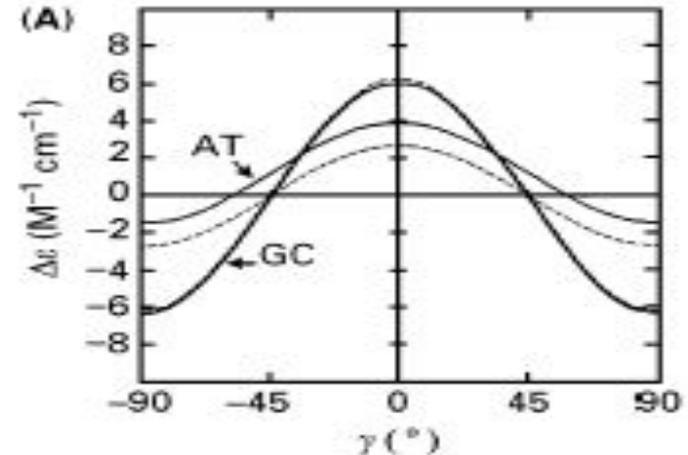
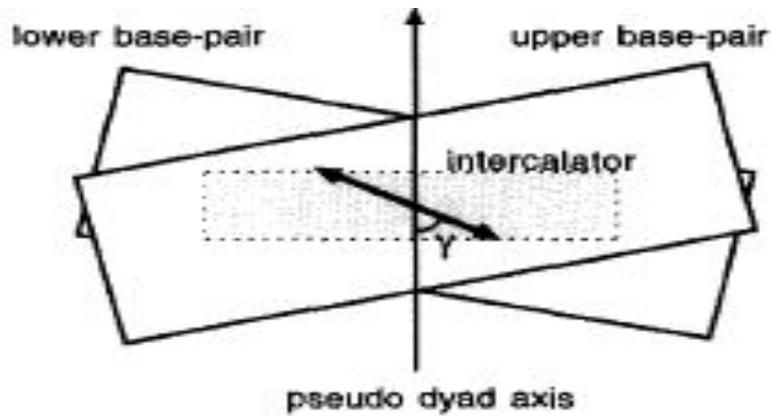
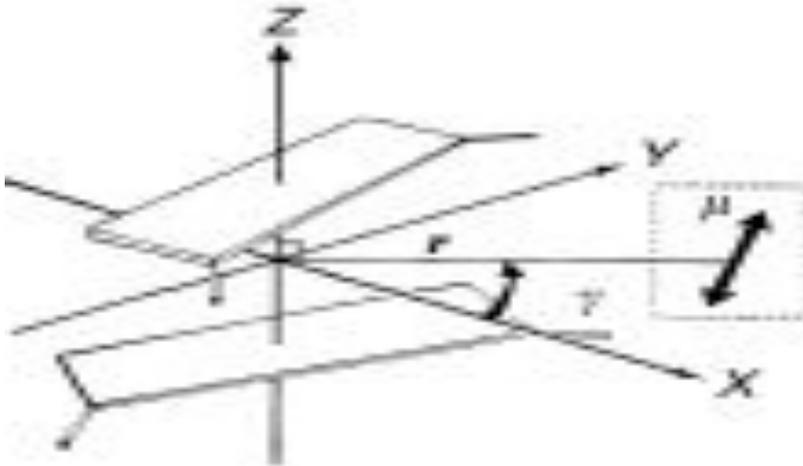
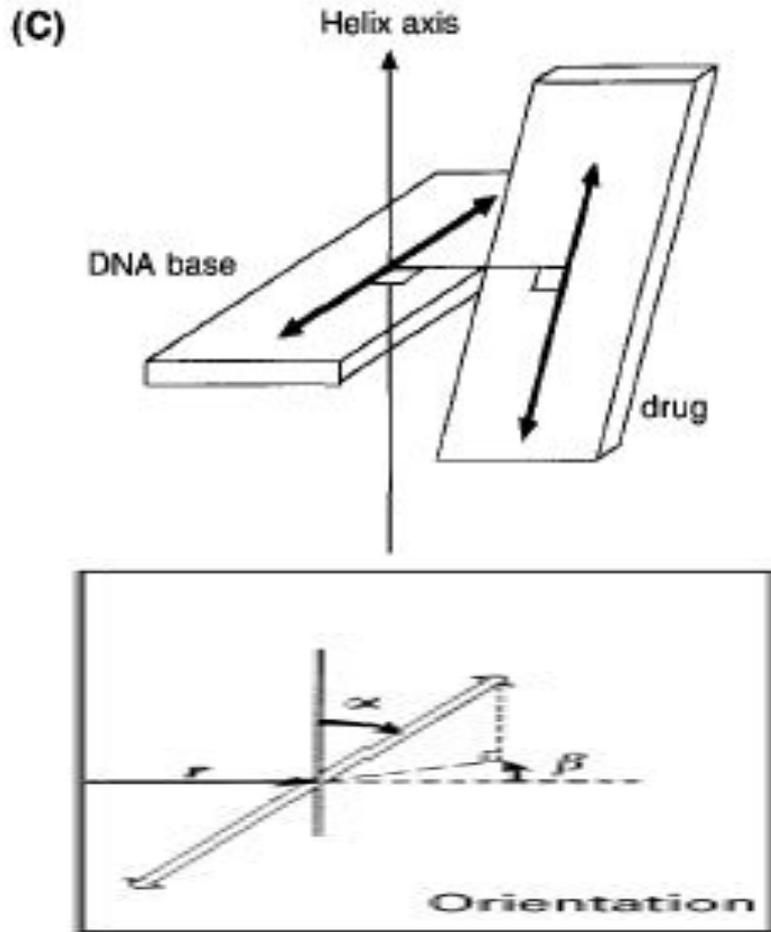


Figure 2 (A) ICD of a DNA intercalator calculated as a function of the transition moment in the plane of the intercalation pocket and centred on the helix axis. γ is the angle between the transition moment and the DNA dyad axis. Reproduced with permission from Lyng, Hard and Nørdén (1987) *Biopolymer* 26: 1327. (B) definition of geometrical parameters of a DNA-ligand system: with $r = 0$, $\alpha = 90^\circ$ and $\beta = 0^\circ$, then γ corresponds to the orientation of an intercalator transition moment (see top figure).

$$R = f|\mu|^2(1 - 2 \cos^2 \gamma)$$

Бороздочное связывание



(B) definition of geometrical parameters of a DNA-ligand system: with $r = 0$, $\alpha = 90^\circ$ and $\beta = 0^\circ$, then γ corresponds to the orientation of an intercalator transition moment (see top figure). Typical minor groove binding geometry parameters are $r = 7 \text{ \AA}$, $\alpha = 45^\circ$, $\beta = 0^\circ$ and $\gamma = 0$.

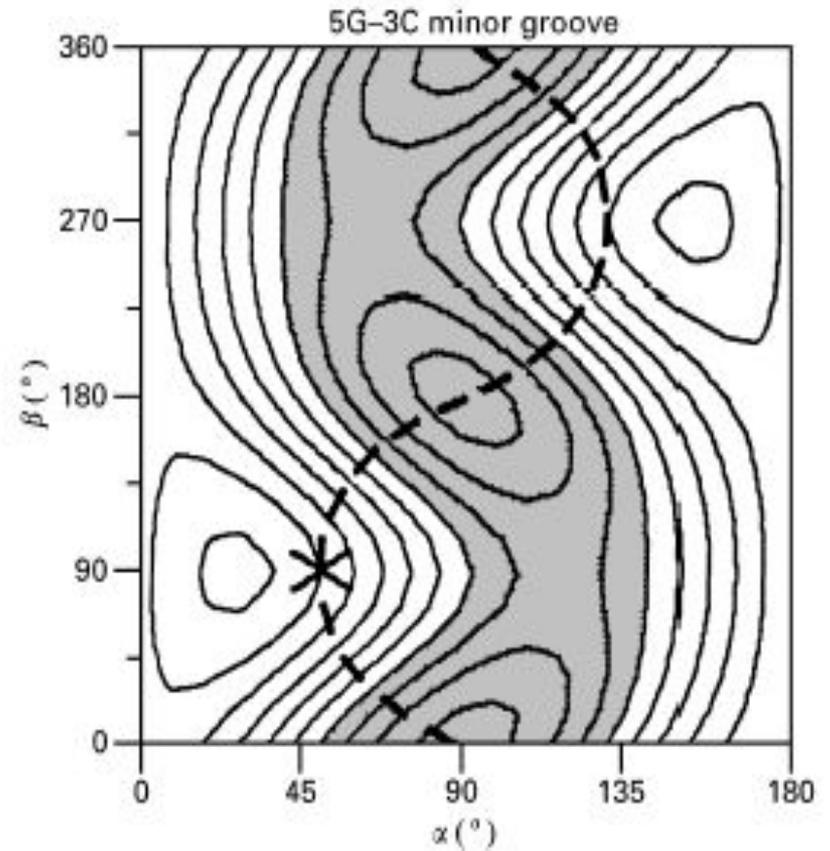
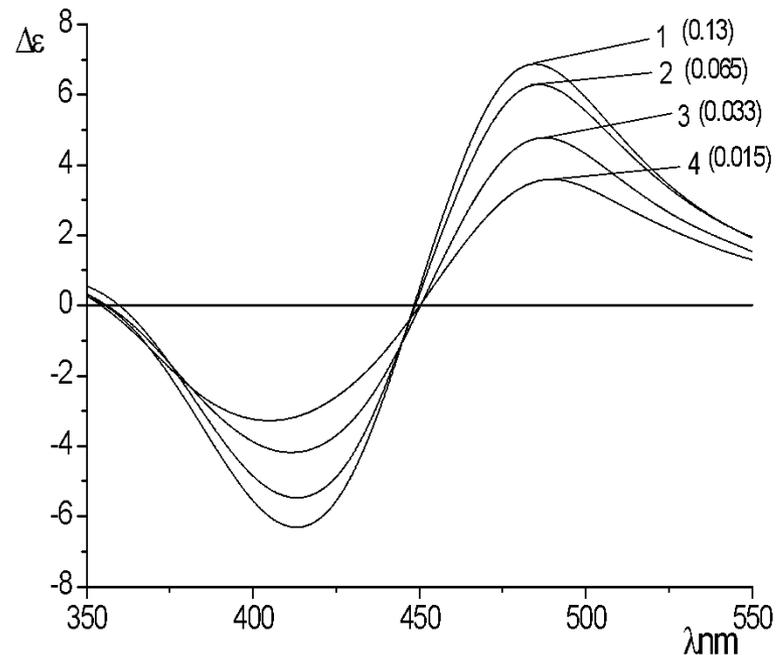
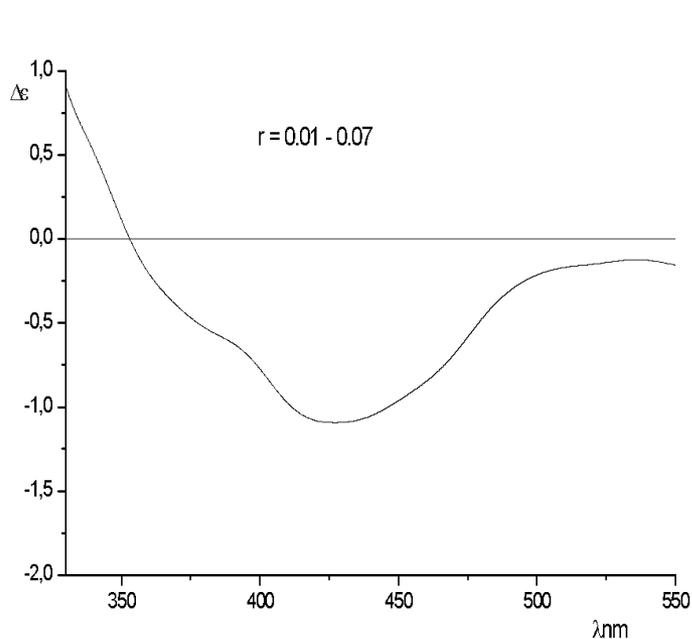


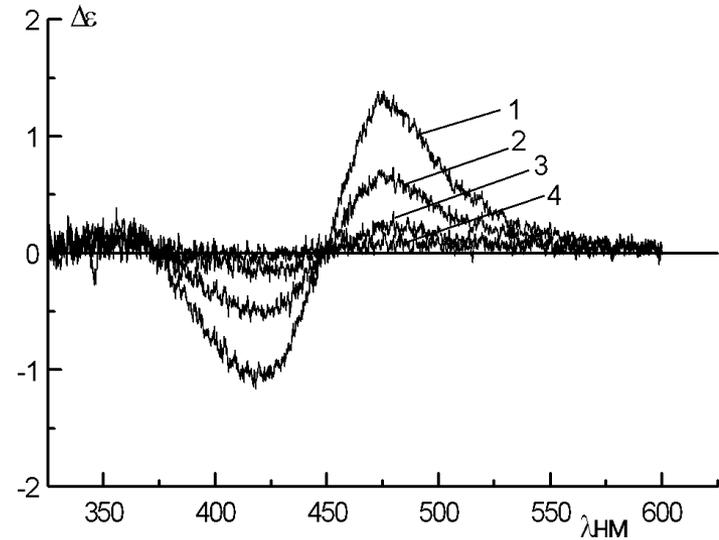
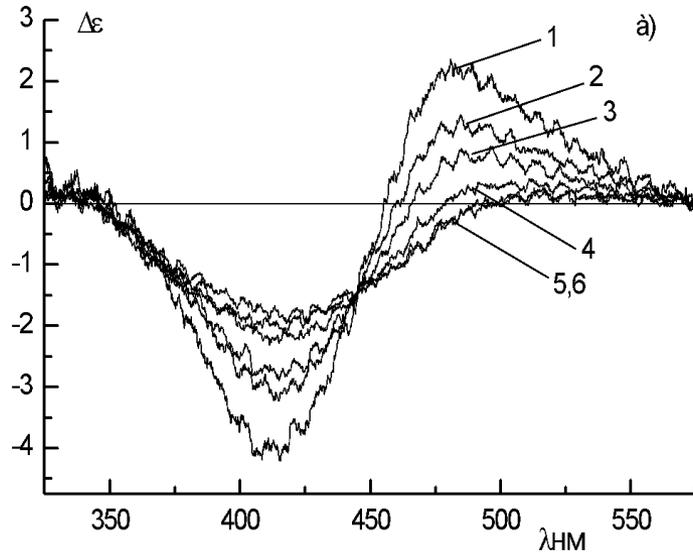
Figure 3 Example of ICD calculated for a minor groove binder (at 5'G-3'C step) as a function of angles α and β (see Figure 2). Reproduced with permission of Wiley from Lyng, Hard and Nordén (1991) *Biopolymers* 31: 1709.

ИКД связанных с ДНК мономеров и димеров актиноцина



- ИКД изолированного мономера (интеркаляция)
- Экситонное взаимодействие (димеры)

Преобразование спектров ИКД

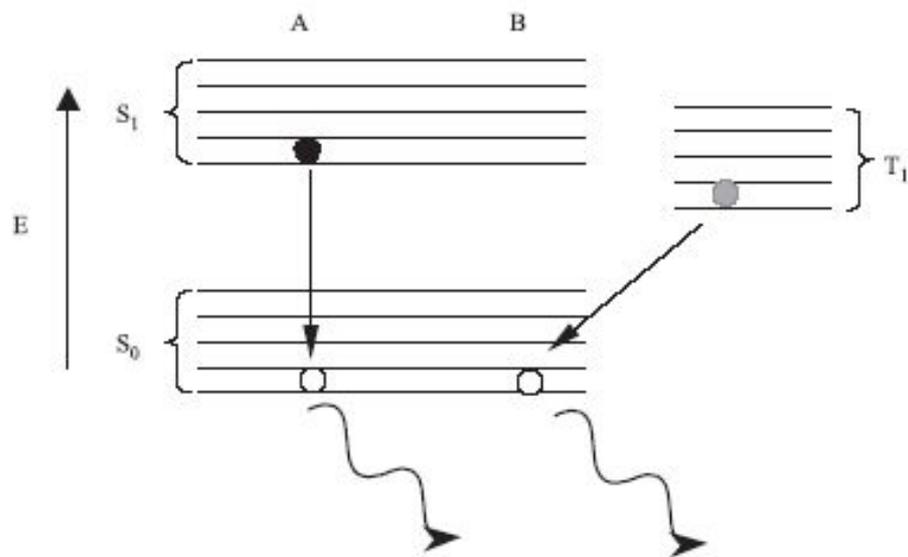
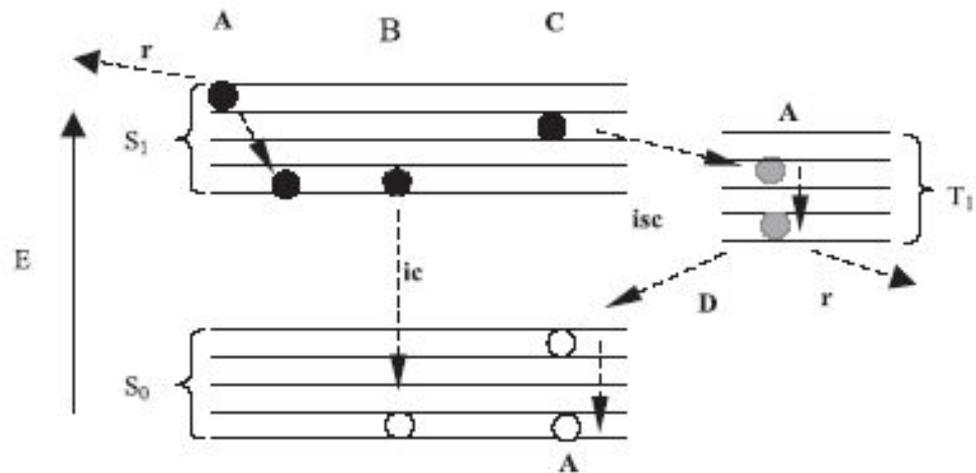
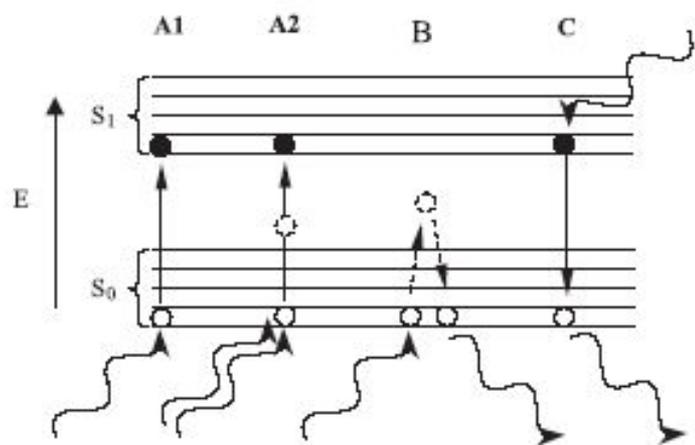


- Спектры ИКД связанных и взаимодействующих мономеров
- Результат вычитания из спектров взаимодействующих мономеров предельного спектра (при $r=0.02$) - экситонная составляющая ИКД

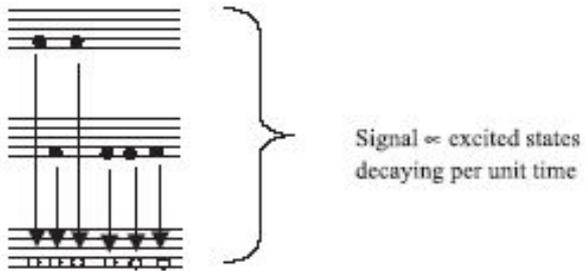
Инфракрасная спектроскопия

Флуоресцентная спектроскопия

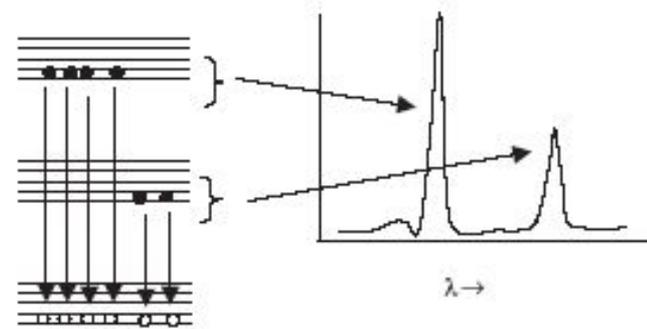
- Физическая основа - испускание света при переходе из возбужденного в основное состояние - временной масштаб 10^{-9} - 10^{-8} с.
- Наблюдаемые параметры
 - 1) Квантовый выход - отношение числа излученных фотонов к числу поглощенных - зависит от:
 - а) внутренняя конверсия (колебательные свободы)
 - б) столкновение и комплексообразование с тушителем
 - в) интеркомбинационная конверсия (переход в триплетное возбужденное состояние)
 - 2) Форма и положение спектра возбуждения и излучения (флуоресценции)
 - а) нет зависимости от длины волны возбуждения
 - б) сдвиг в область более низких энергий относительно полосы поглощения
 - в) зеркальное отражение длинноволновой полосы поглощения
 - 3) Время жизни
 - 4) Поляризация



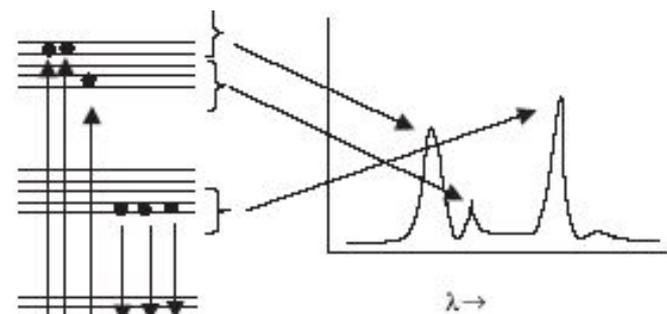
A. Intensity



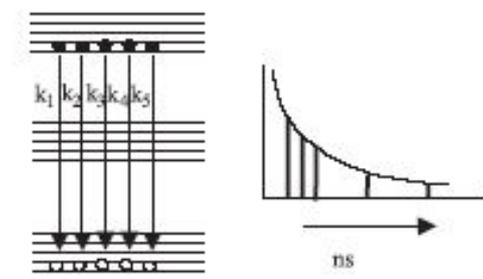
B. Emission Spectrum



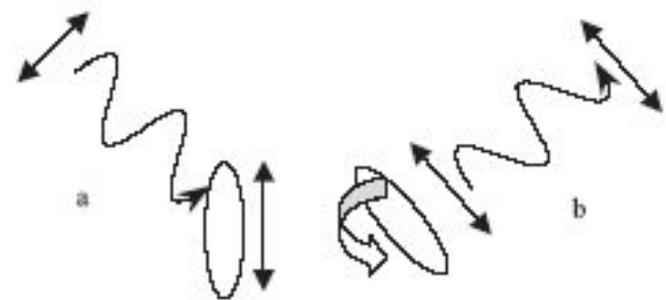
C. Excitation Spectrum



D. Lifetime

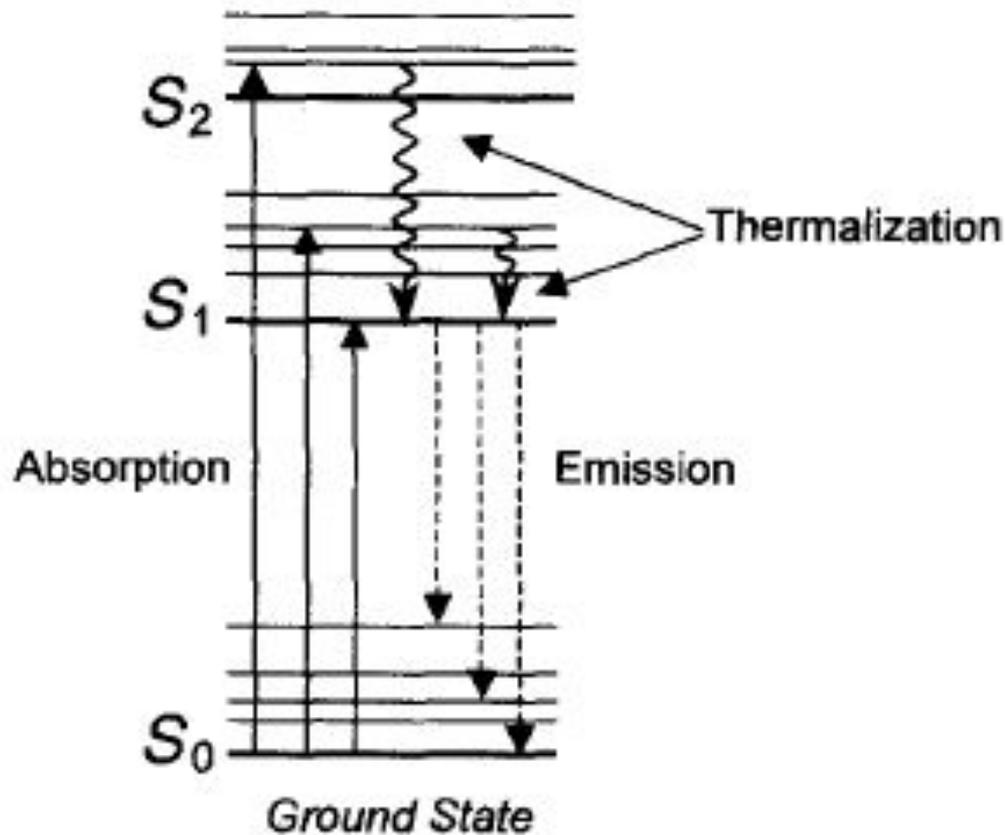


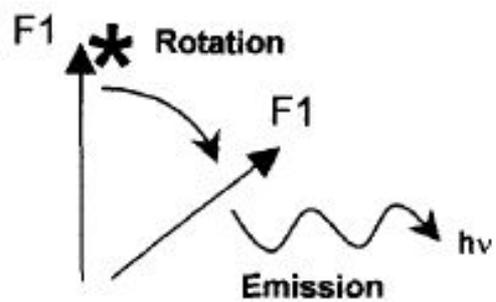
E. Polarisation



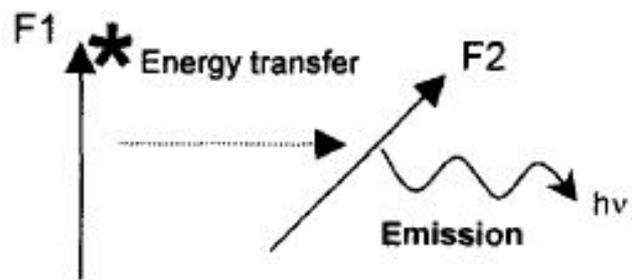
[1] Fluorescence: Basic Concepts, Practical Aspects, and Some Anecdotes

By DAVID M. JAMESON, JOHN C. CRONEY, and PIERRE D. J. MOENS

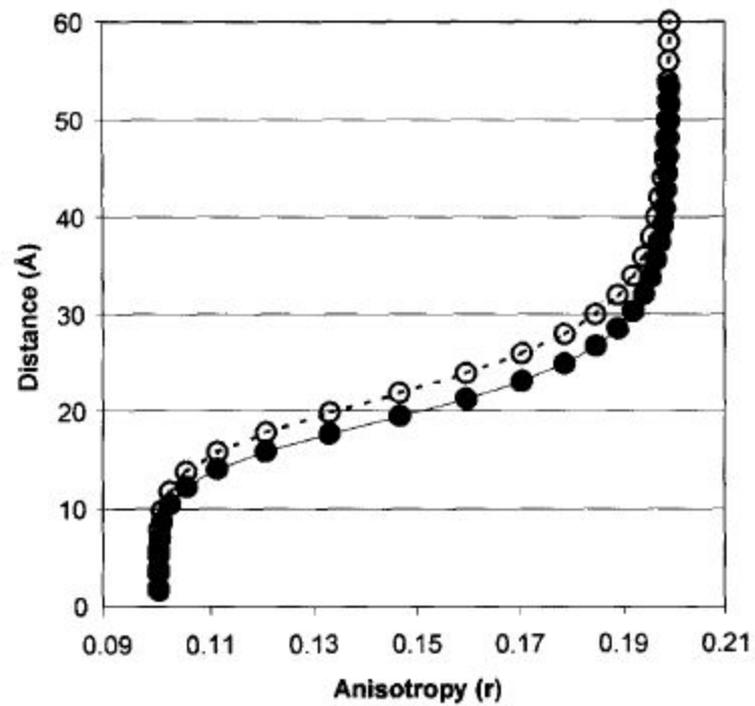




A



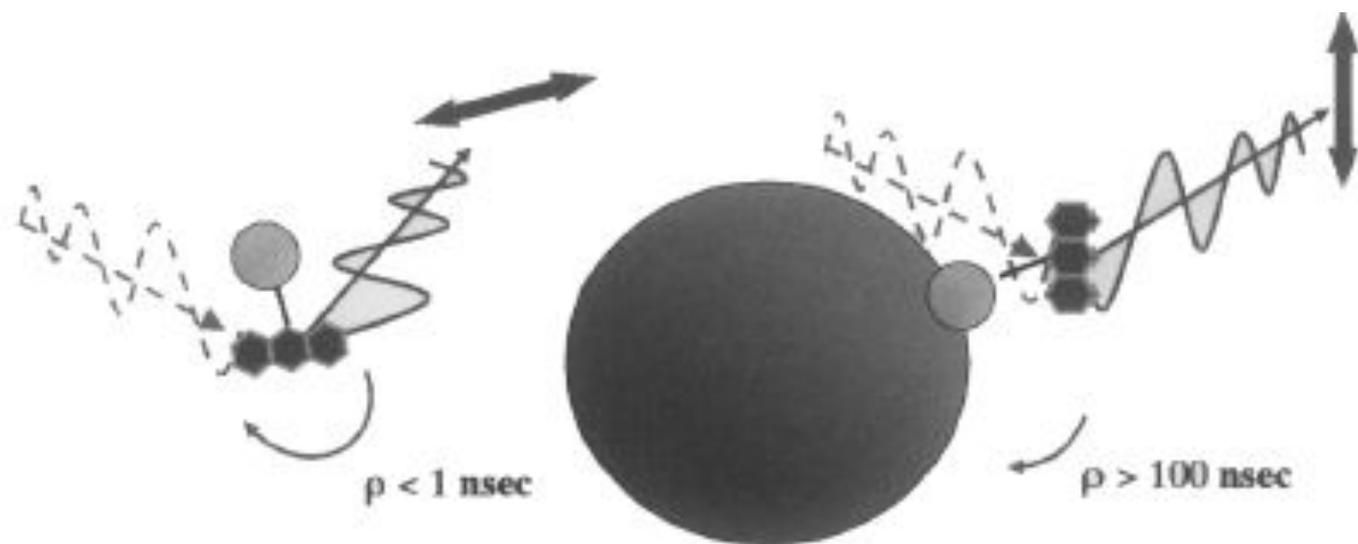
B



[23] Fluorescence Anisotropy in Pharmacologic Screening

By J. RICHARD SPORTSMAN

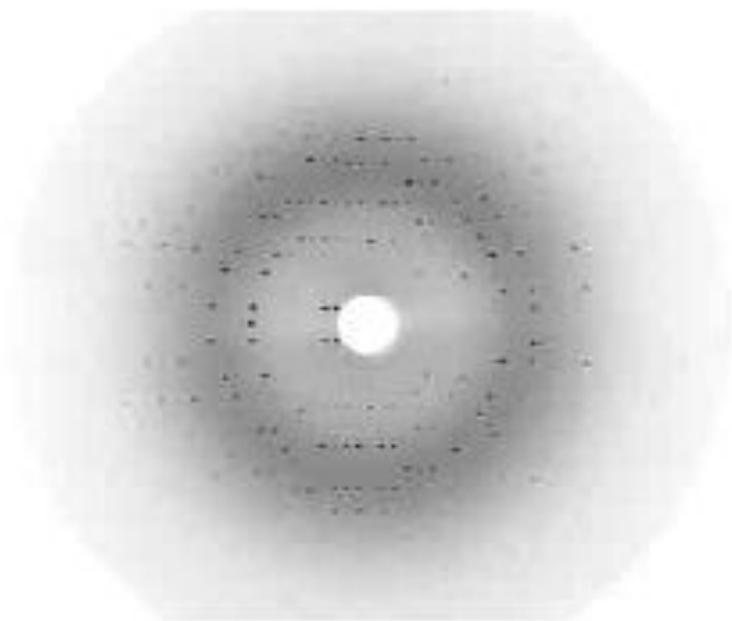
METHODS IN ENZYMOLOGY, VOL. 361



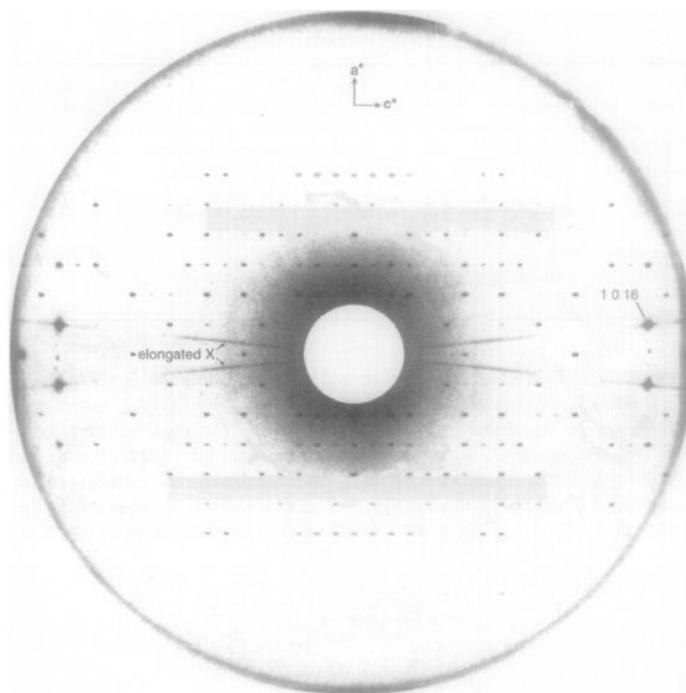
Синглет-синглетный перенос энергии

- Способность хромофоров, удаленных от данного хромофора (до 80Å), находящегося в возбужденном синглетном состоянии, вызывать тушение его флуоресценции - слабые взаимодействия
 - а) донор и акцептор энергии (D и A)
 - б) возникновение резонанса - совпадение энергии излучения D с энергией поглощения A
 - в) теория Ферстера - зависимость от расстояния между D и A

Примеры рентгенограмм (дифракционных картин)



Белок



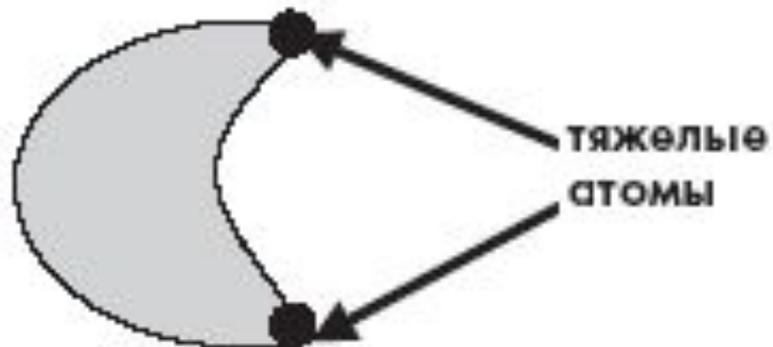
ДНК-порфирин

Изоморфное замещение

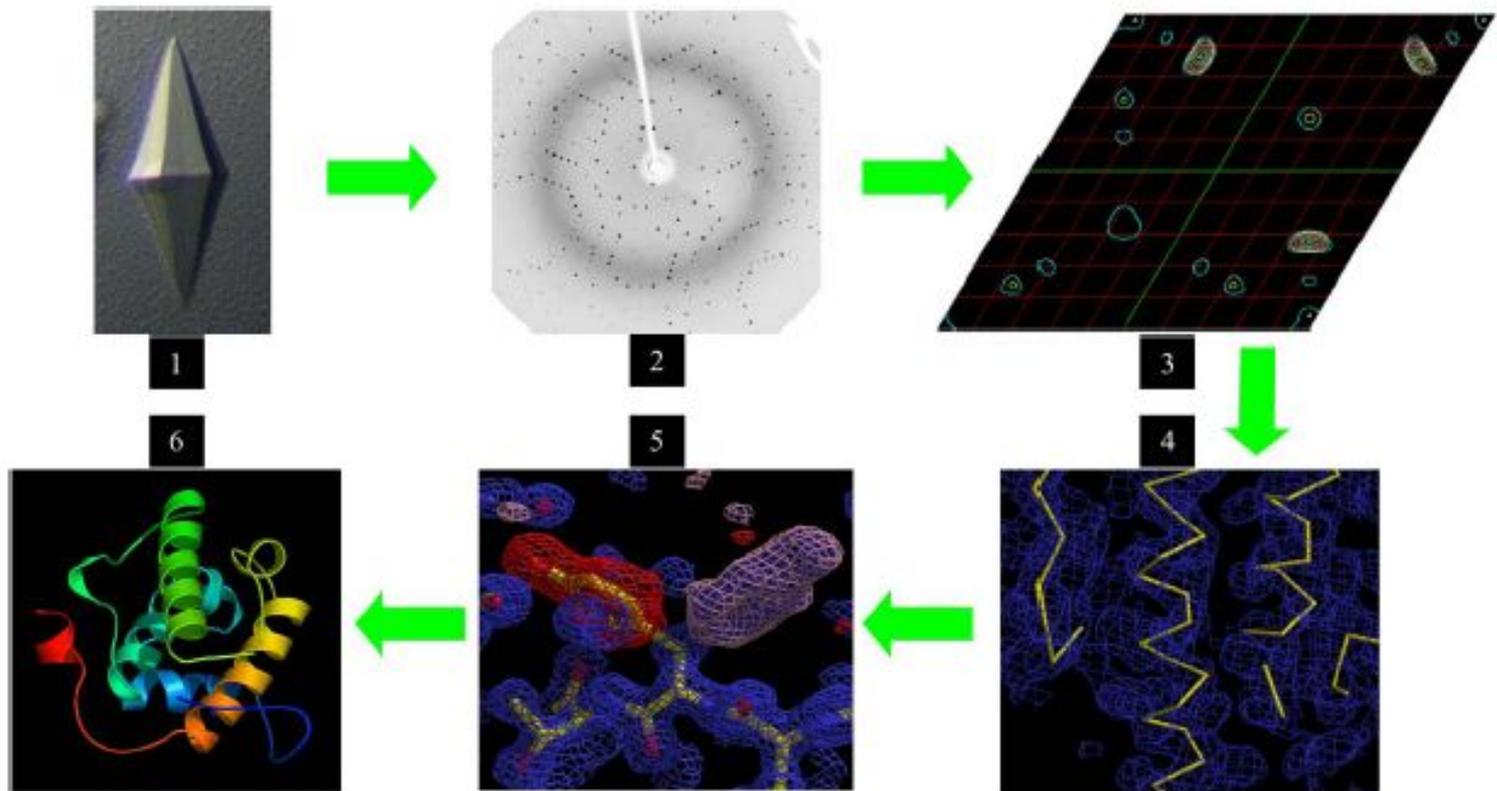
нативный белок



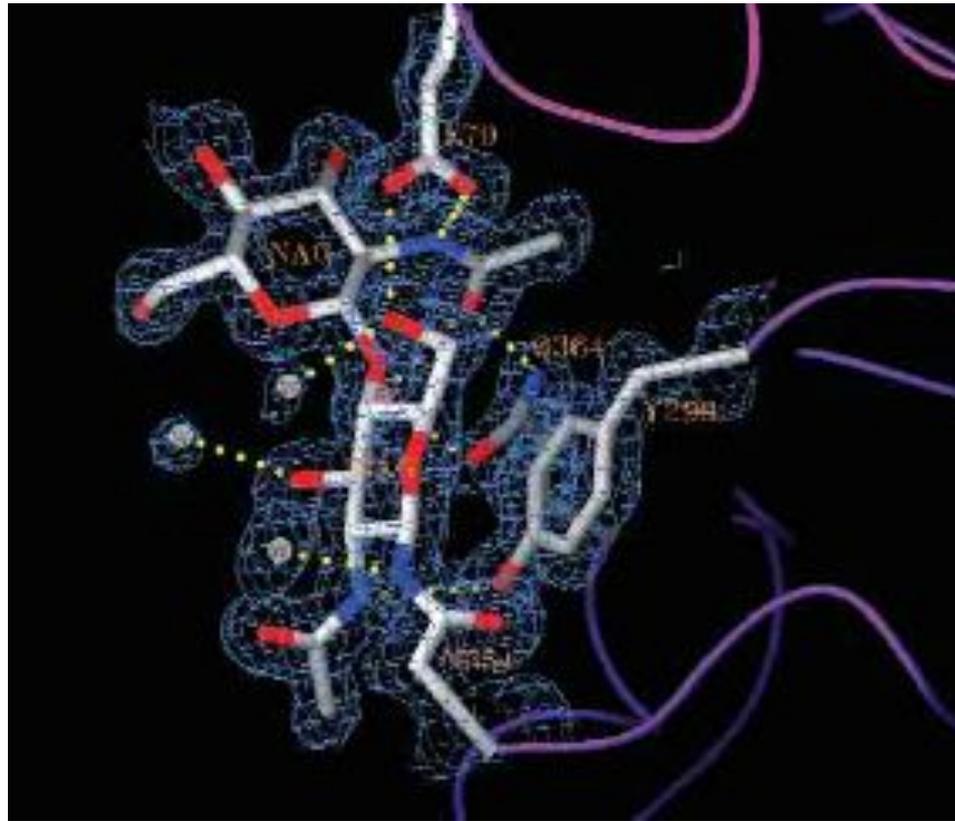
изоморфное производное



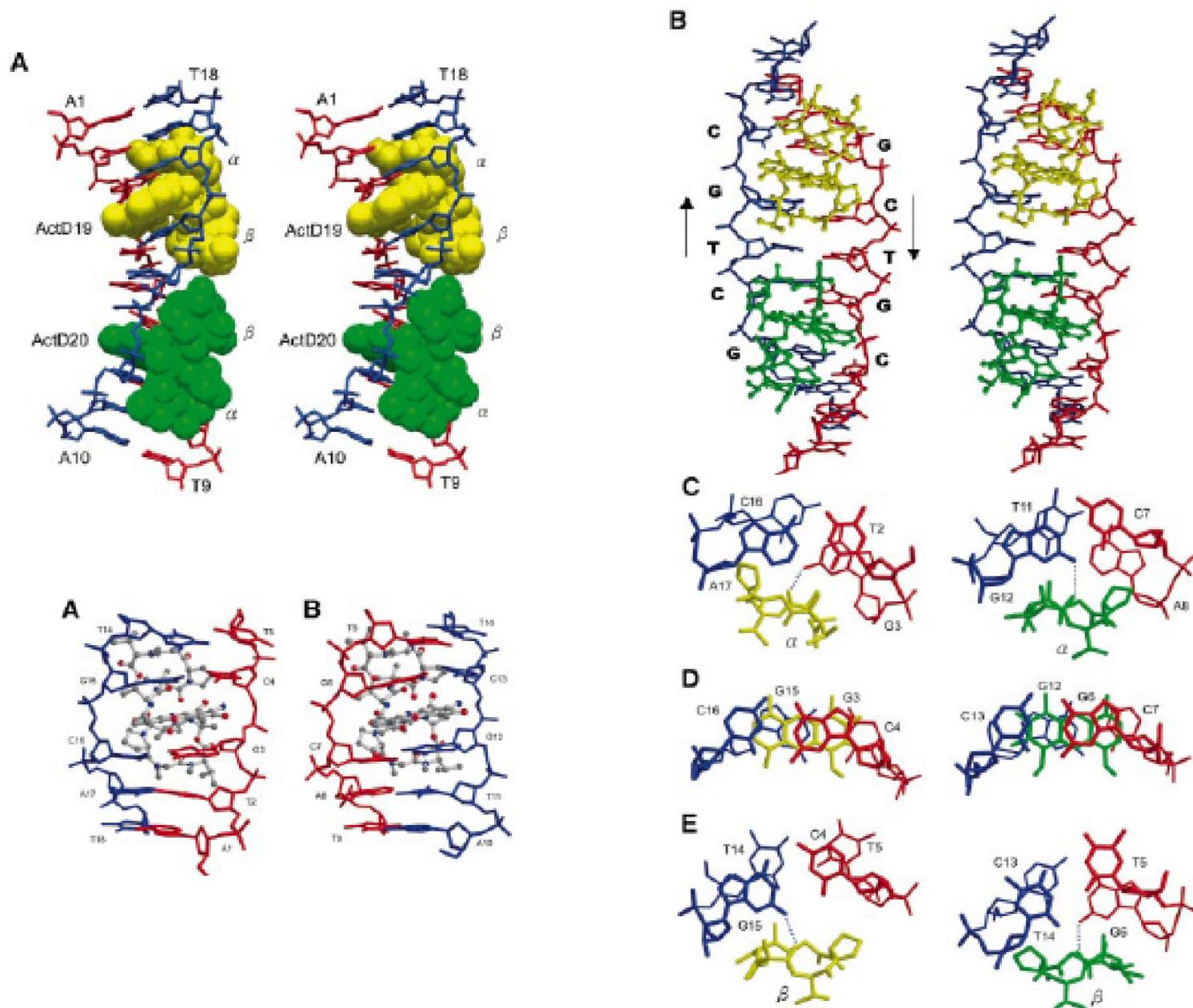
Процесс определения структуры белка по дифракции на одиночном кристалле и использованию явления аномального рассеяния



Пример модели, вписанной в карту электронной плотности



Кристаллическая структура комплекса ДНК-актиномицинD



Кристаллическая структура комплекса ДНК с дисахаридными антрациклинами

