

ЛЕЦИЯ №1

- Природа сил взаимодействия
- Методы исследования комплексообразования:
 - 2) равновесный диализ
 - 5) вискозиметрия – ДЛП
 - 4) седиментация
 - 3) гель-электрофорез
 - 6) масс-спектрометрия
 - 7) плазмонный резонанс
 - 8) атомная силовая микроскопия
 - 9) рентгено-структурный анализ

Природа сил взаимодействия

- Вандерваальсовы взаимодействия

а) Кезом - ориентационный эффект - диполь-дипольное взаимодействие

$$U_{\text{ор.}} = -2p_1^2 p_2^2 / 3kTr^6$$

б) Дебай - индукционный эффект - диполь-индуцированный диполь

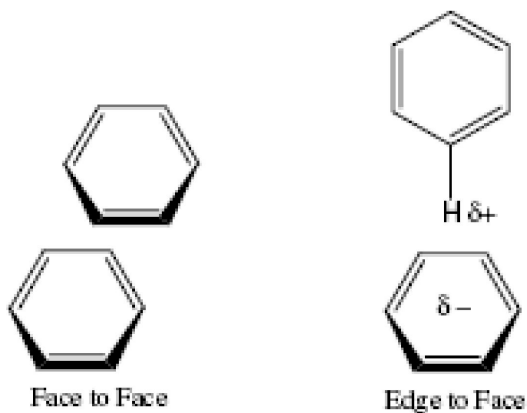
$$U_{\text{индукц.}} = -1/2 (aE^2) = -2ap^2/r^6$$

в) Лондон - дисперсионный эффект - взаимодействие мгновенных диполей

$$U_{\text{дисп.}} = -s(h/2\pi)\omega_0(e^4/k^2r^6) = -s(h/2\pi)\omega_0(a^2/r^6)$$

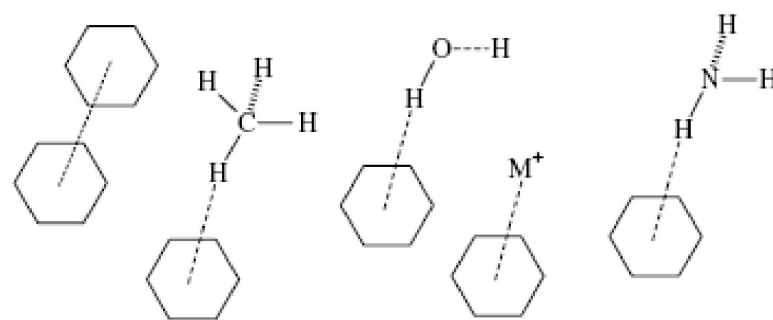
- Водородные связи
- Ионные взаимодействия
- Гидрофобные взаимодействия

Типы взаимодействий с участием ароматических систем



Parallel aromatic
interaction

Perpendicular
aromatic interaction



CH-π

Cation-π

Ультрафилтрация

Конкурентный равновесный диализ



Fig. 1. Microdialyzer for 96 samples.

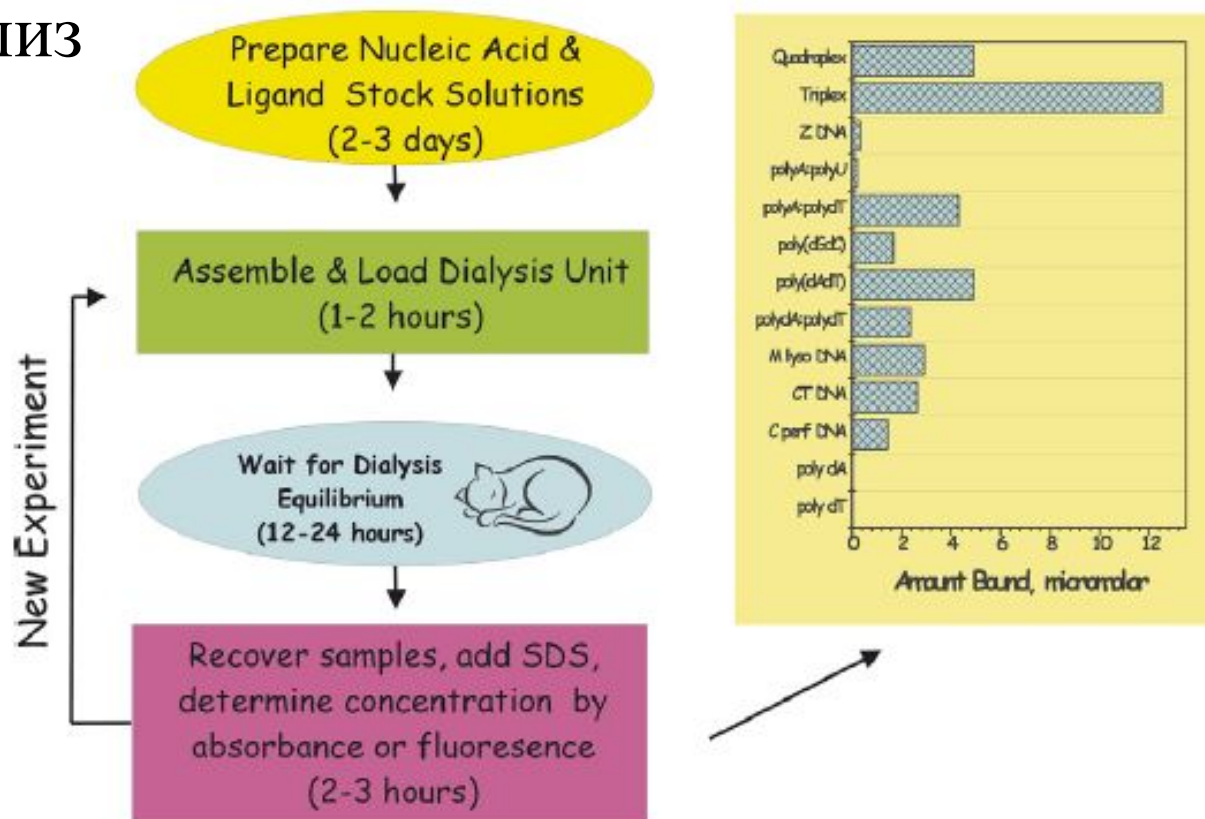


Fig. 2. Overview of the competition dialysis experiment.

Гидродинамические методы

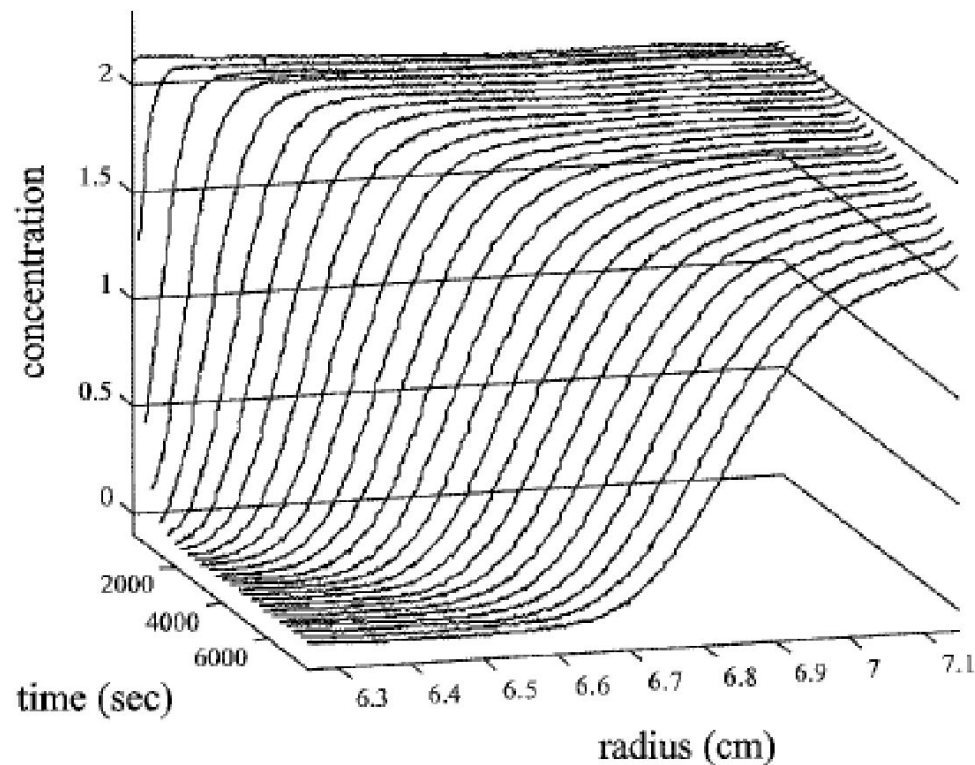
- Вискозиметрия
 - а) Связь характеристической вязкости с макромолекулярными параметрами для разных моделей
 - б) Изменение этих параметров в зависимости от способа связывания макромолекулы (ДНК) с лигандом
- Динамическое двойное лучепреломление
 - а) Определение термодинамической жесткости макромолекулы
 - б) Изменение термодинамической жесткости и оптической анизотропии макромолекулы (ДНК) при связывании с лигандами

Аналитическое центрифугирование

Соотношение Сведберга

$$s = \frac{u}{\omega^2 r} = \frac{M(1 - \bar{v}\rho)}{N_A f} = \frac{MD(1 - \bar{v}\rho)}{RT}$$

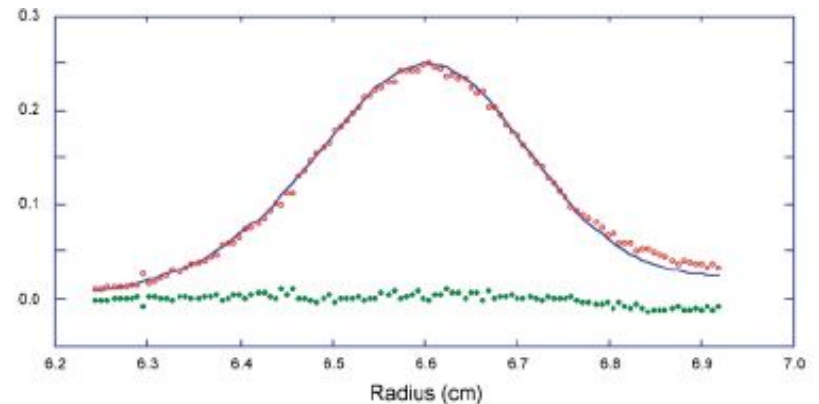
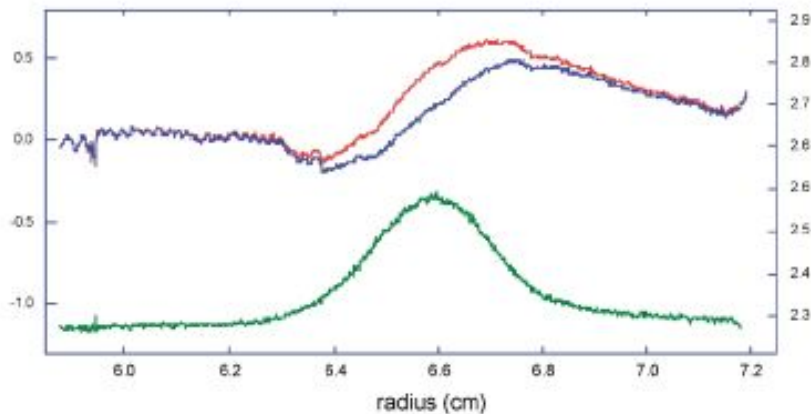
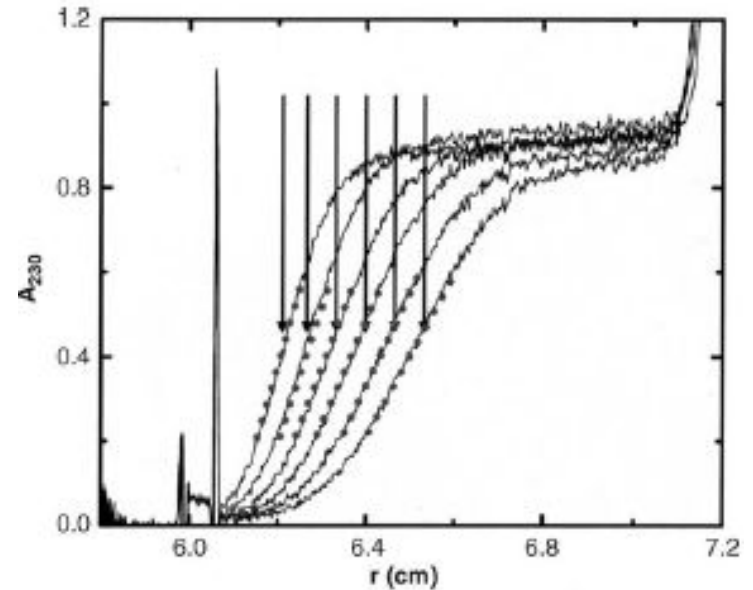
Эксперимент: определение скорости, с которой концентрационная граница движется в гравитационном поле



Обработка результатов аналитического центрифугирования

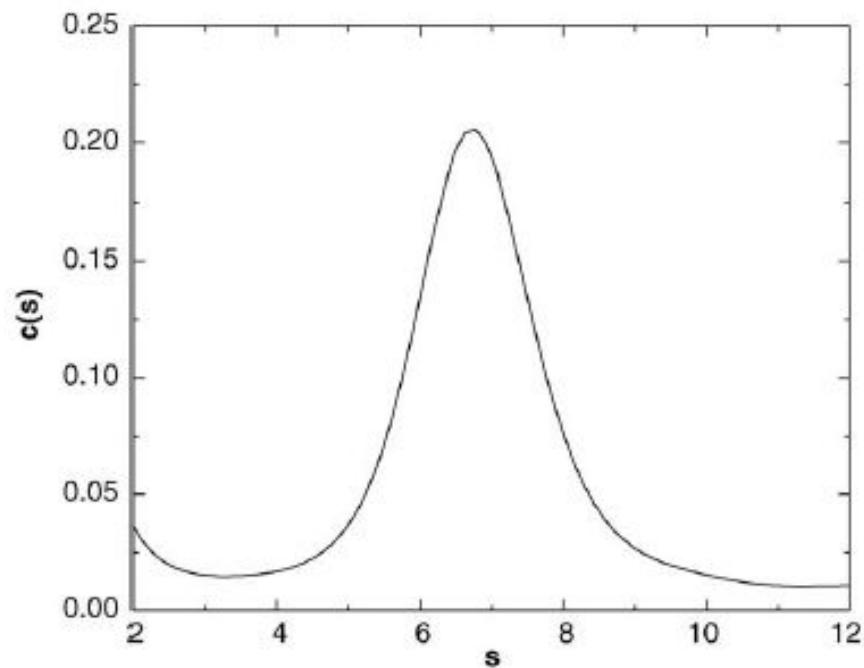
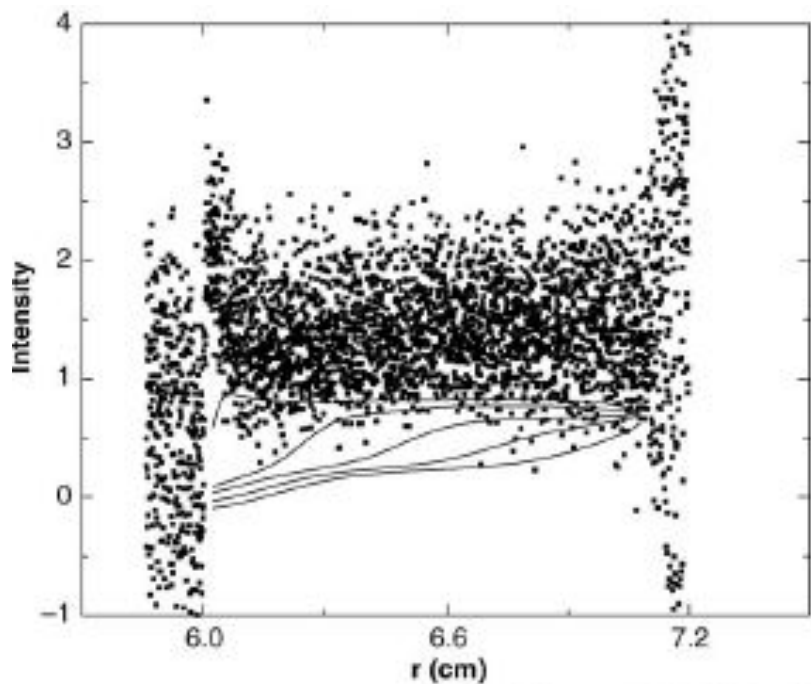
$$\frac{\partial \chi(r,t)}{\partial t} = \frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} \left[rD \frac{\partial \chi(r,t)}{\partial r} - s\omega^2 r^2 \chi(r,t) \right]$$

Соотношение Ламма –
диф. уравнение второго порядка,
решение которого дает коэф.
диффузии и гидродинамический
радиус молекулы



Результат обработки данных с помощью соотношения Ламма

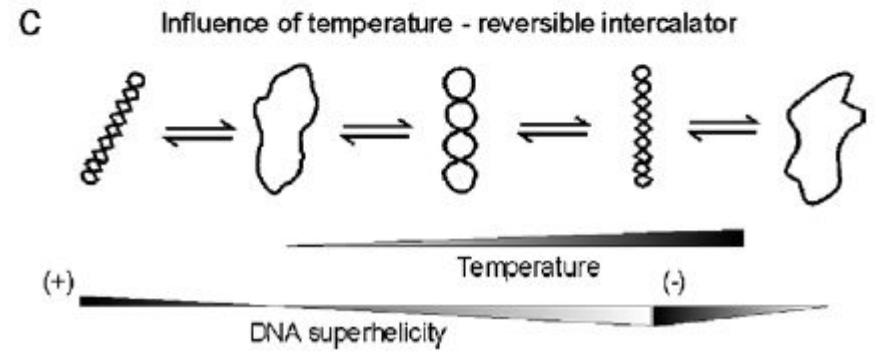
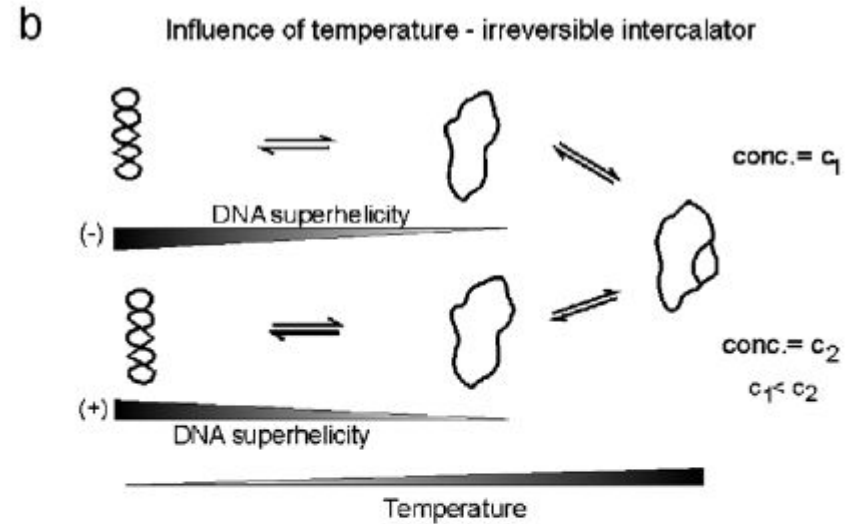
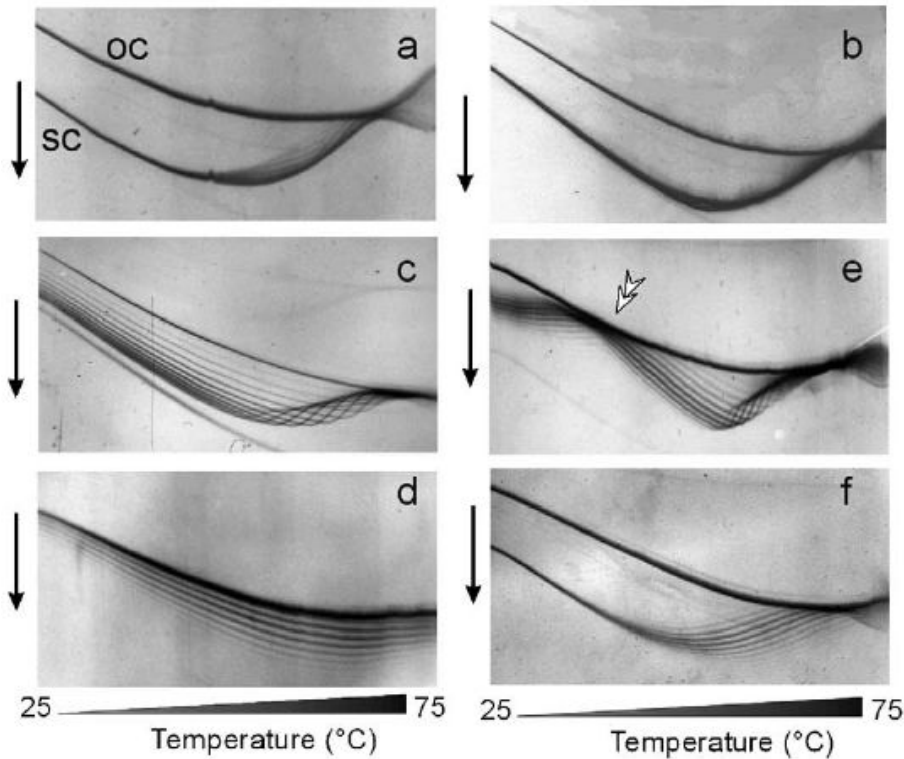
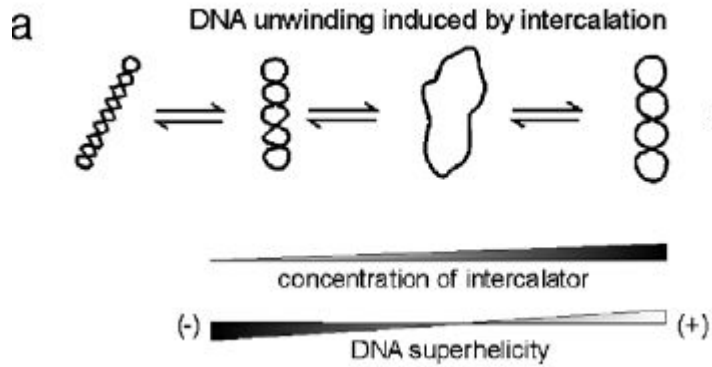
Получение седиментационного профиля трансформацией
сканирующих профилей



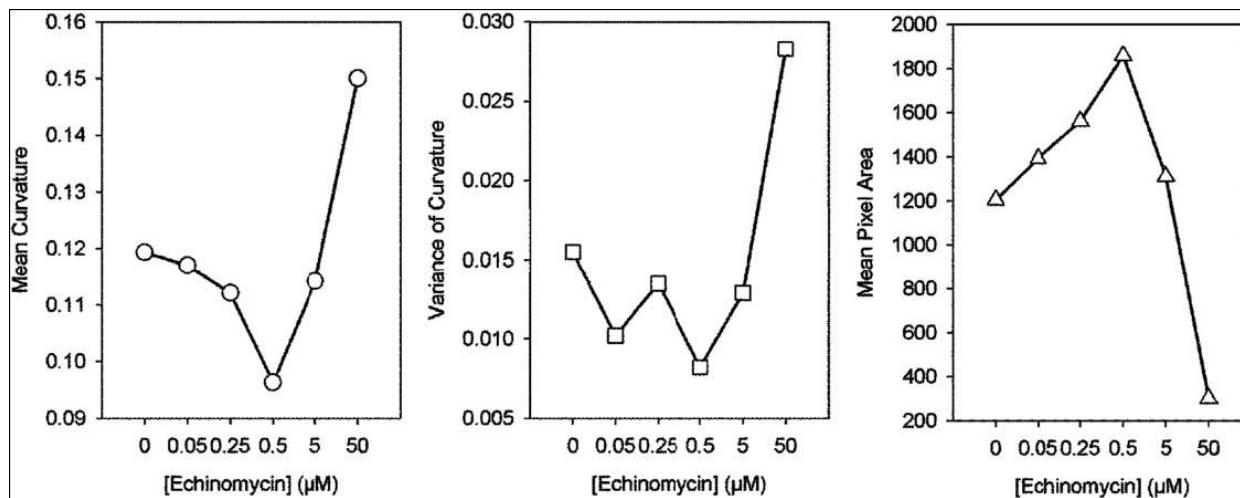
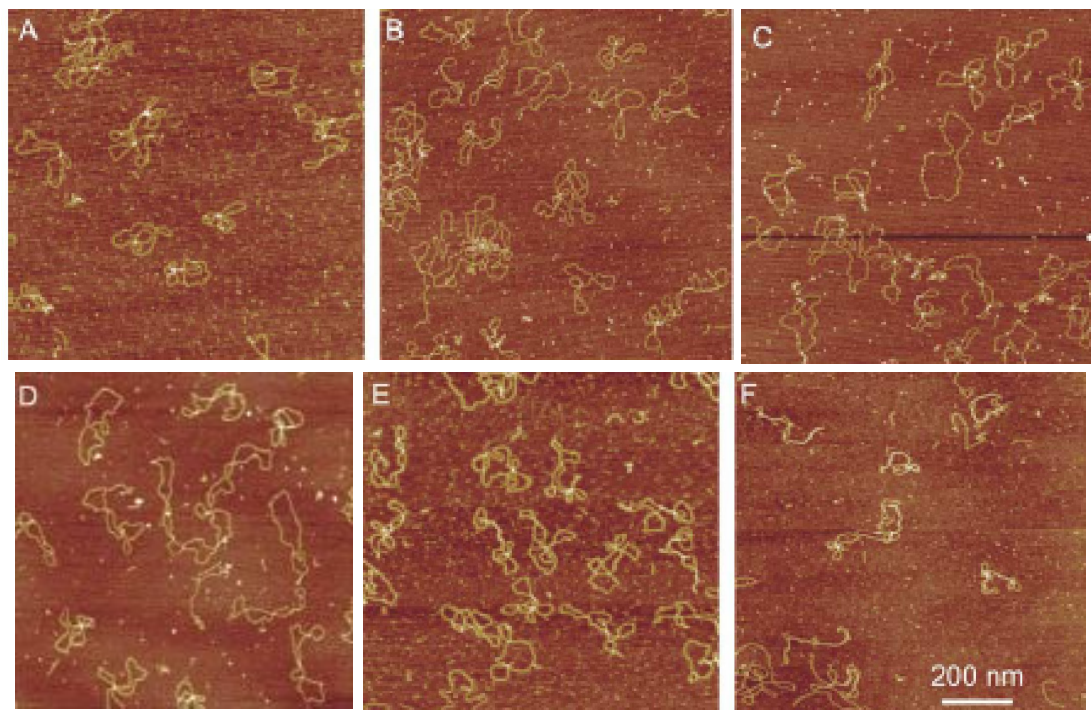
Седиментация (продолжение)

- Достижения, позволившие расширить возможности метода
 - а) создание программ по численному решению соотношения Ламма с получением в одном эксперименте всех параметров
 - б) отфильтровывание всех стохастических и систематических ошибок в процессе решения
 - в) введение флюоресцентной детекции

Гель-электрофорез с градиентом температуры

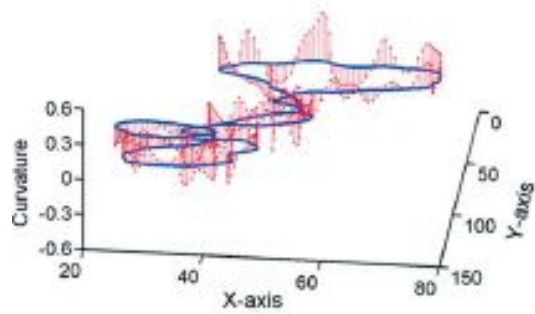


Плазмидная ДНК в атомном силовом микроскопе

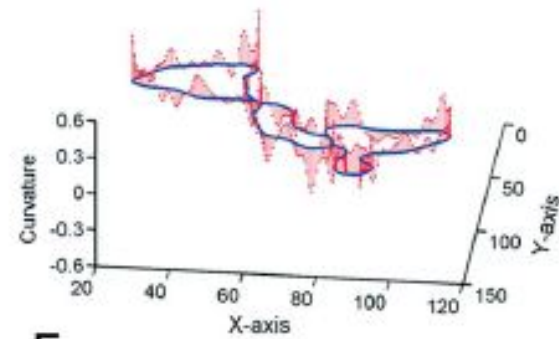


A**B****C**

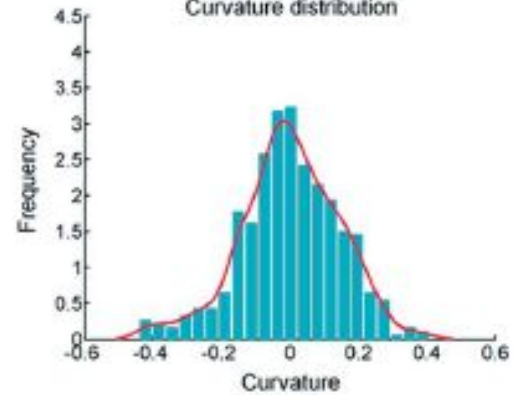
Curvature along the contour

**D**

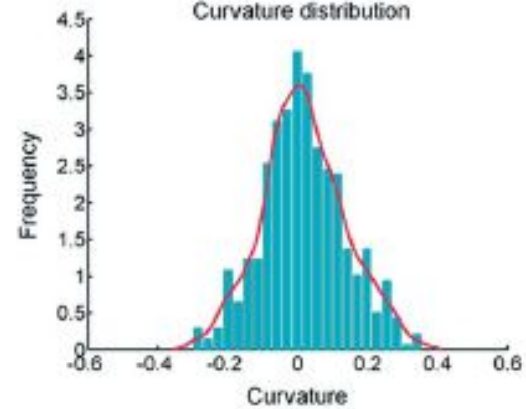
Curvature along the contour

**E**

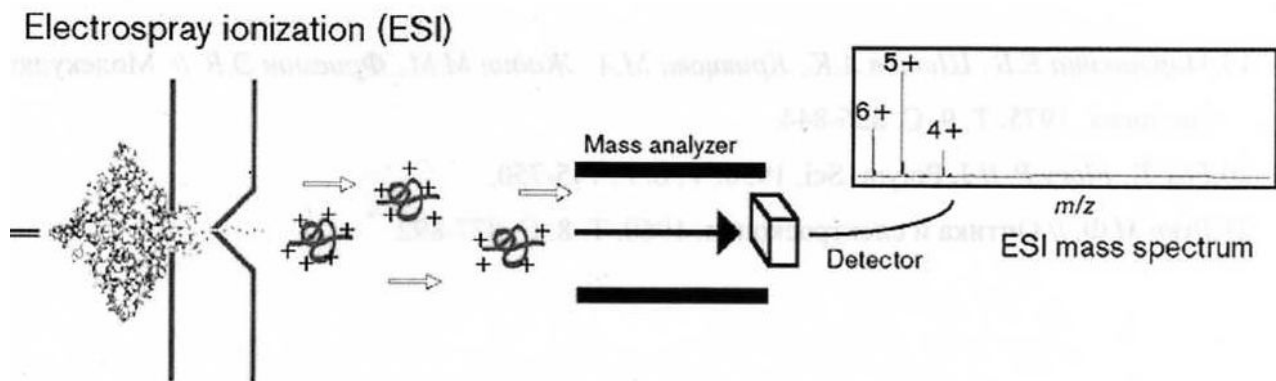
Curvature distribution

**F**

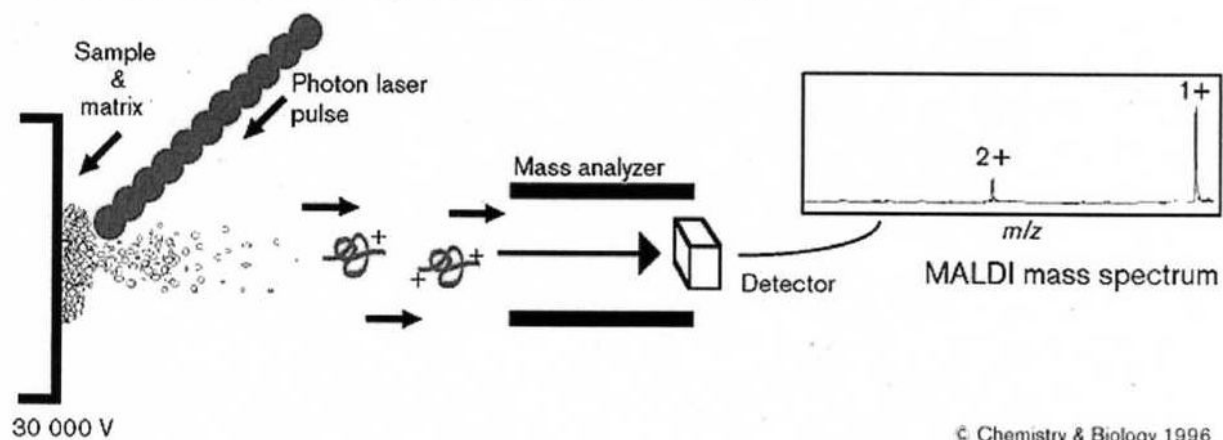
Curvature distribution



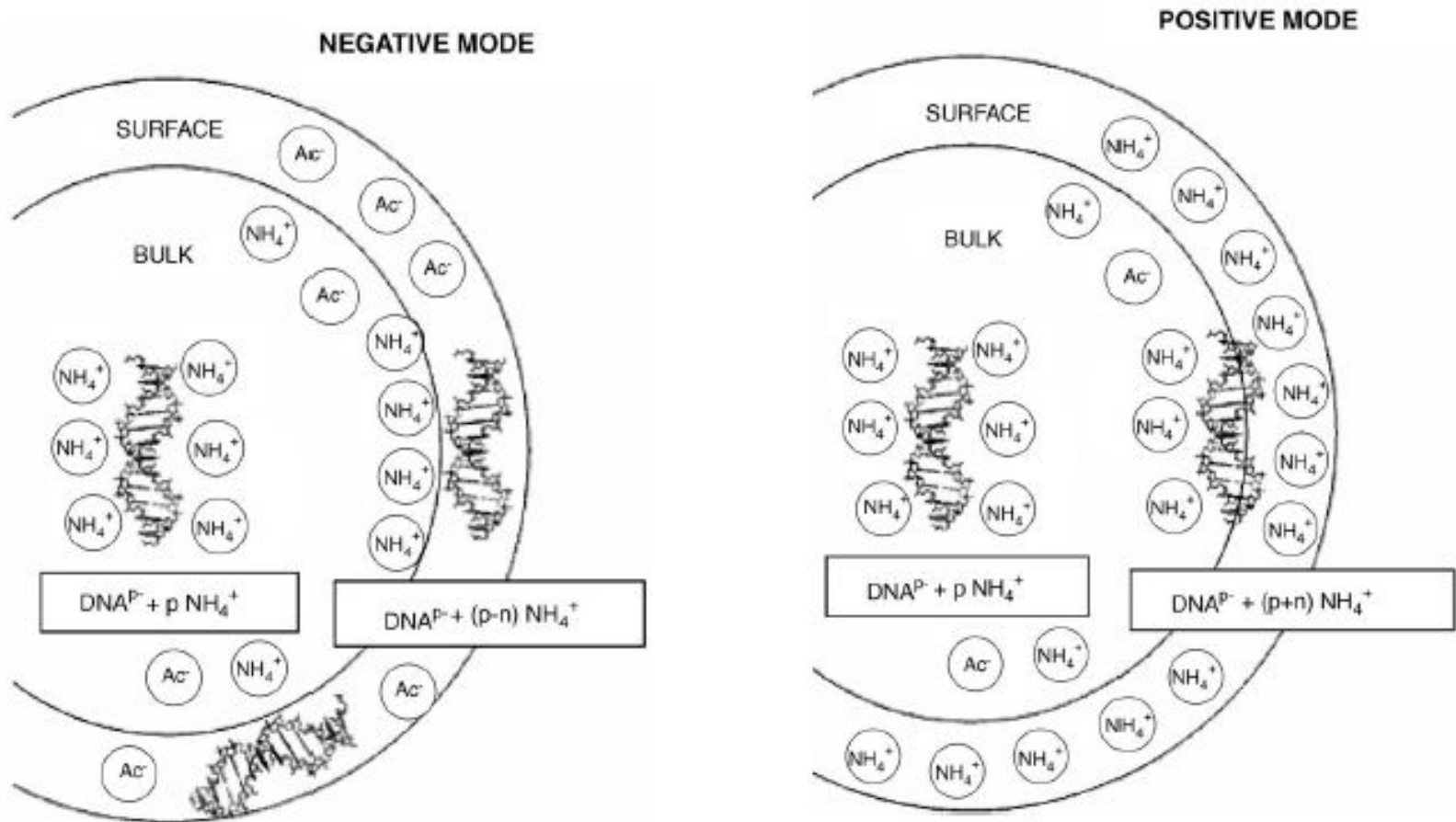
Способы создания многозарядных ионов



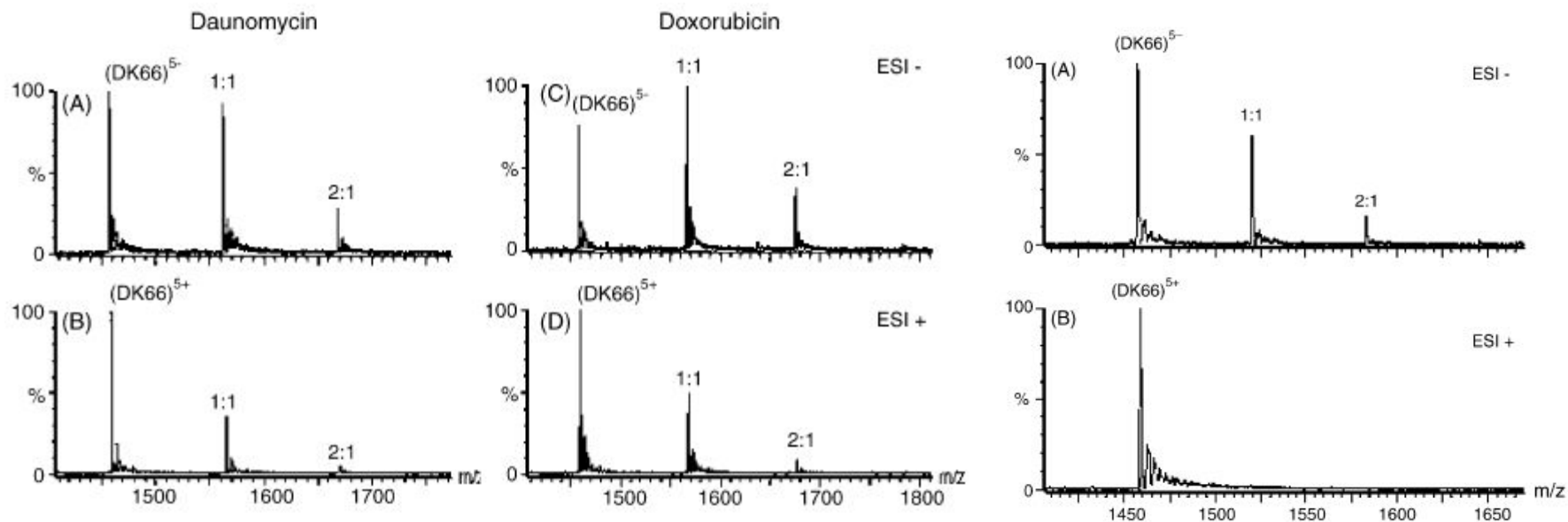
Matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI)



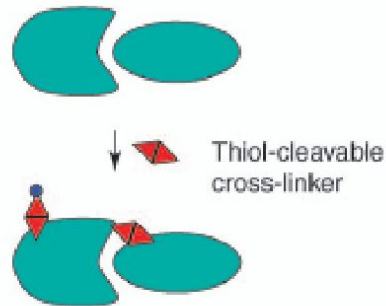
Схематическое представление процесса образования заряженных капель раствора ДНК в ацетате аммония (отрицательная и положительная моды)



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



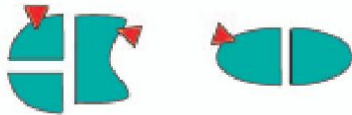
Масс-спектрометрический анализ



Protease

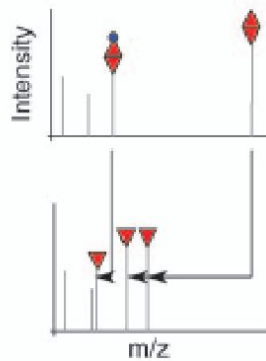


Thiol reagent

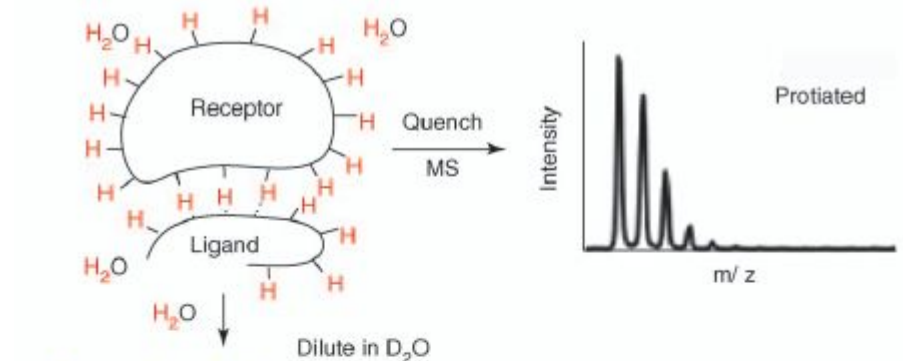


Partially hydrolyzed cross-linker: probes the solvent-accessible surface

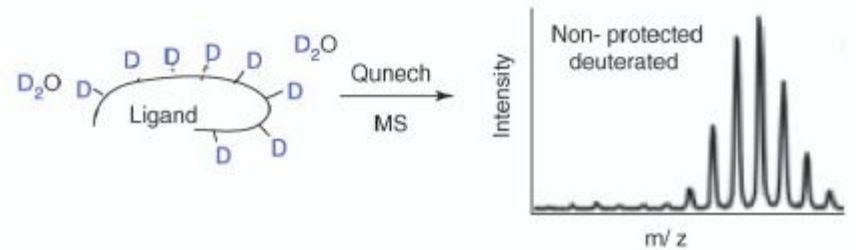
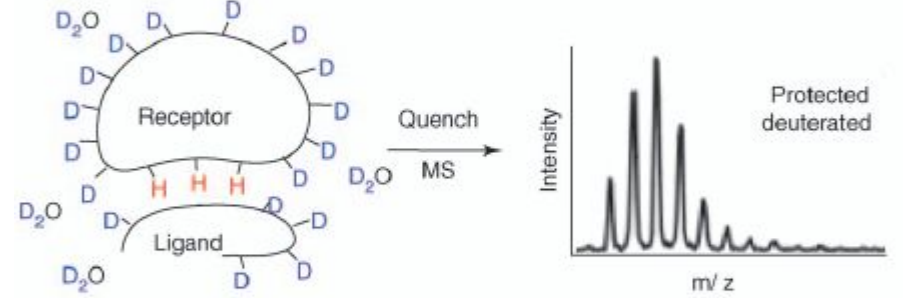
Intermolecular cross-link: probes the boundary of the interaction area



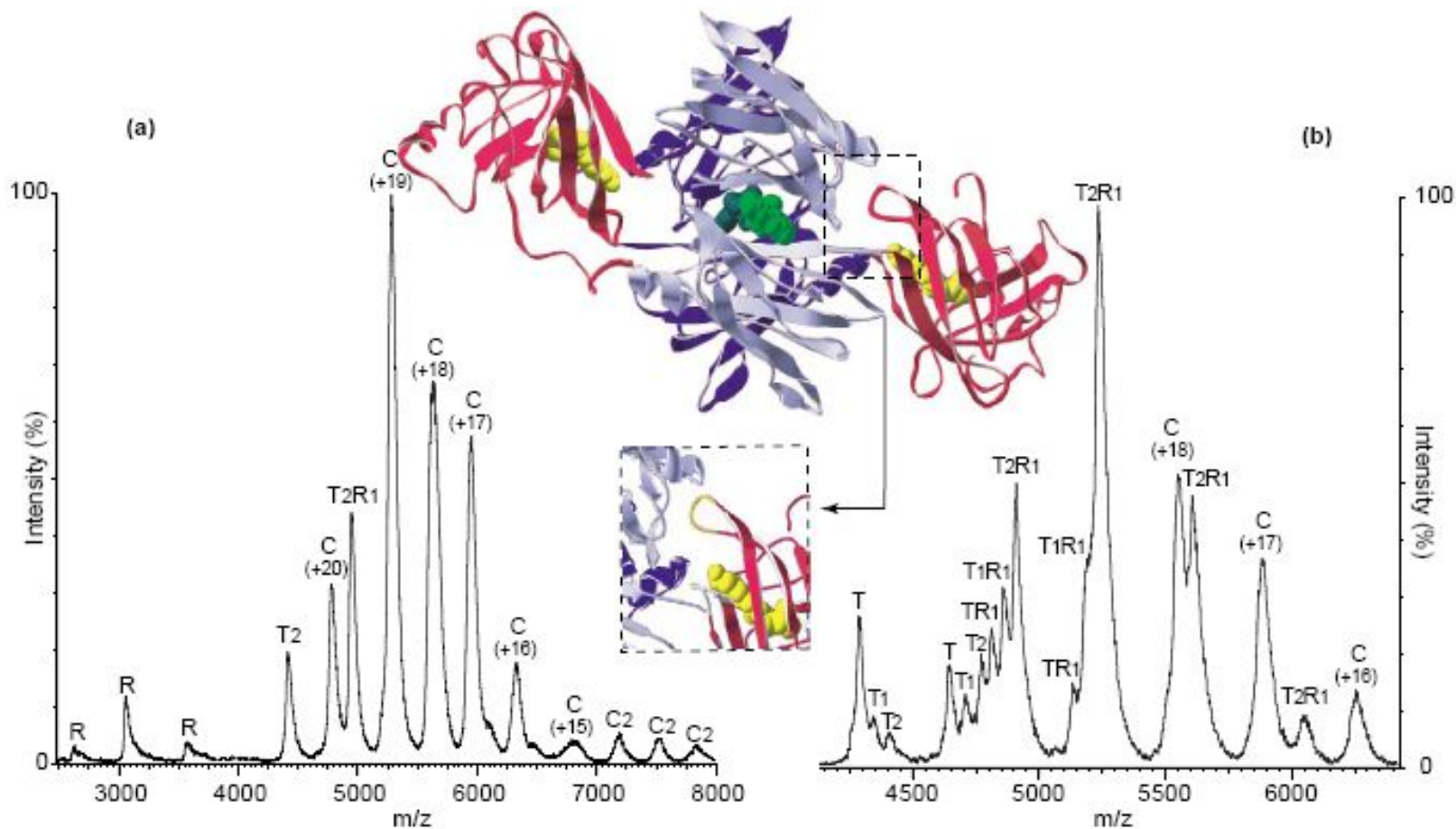
Reduced cross-linker



Dilute in D₂O

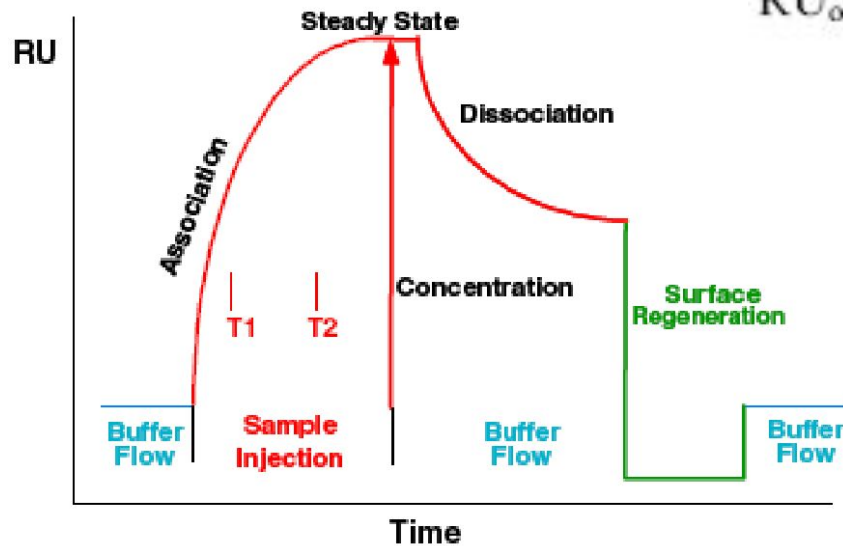
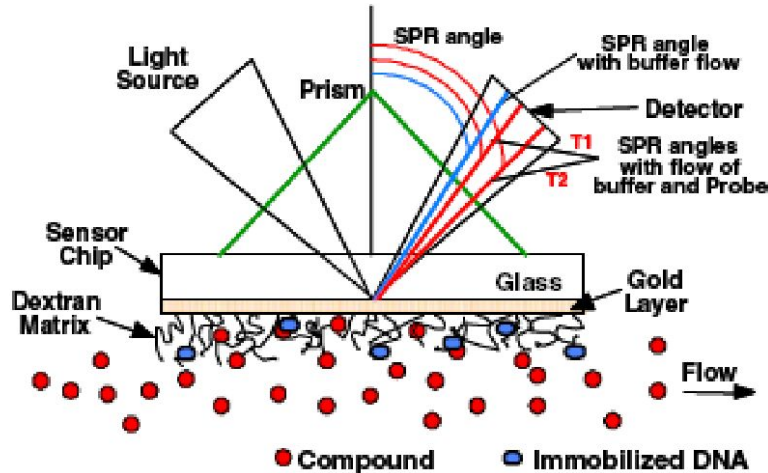


Образование 10-компонентного белкового комплекса с кофакторами и лигандами (а)



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

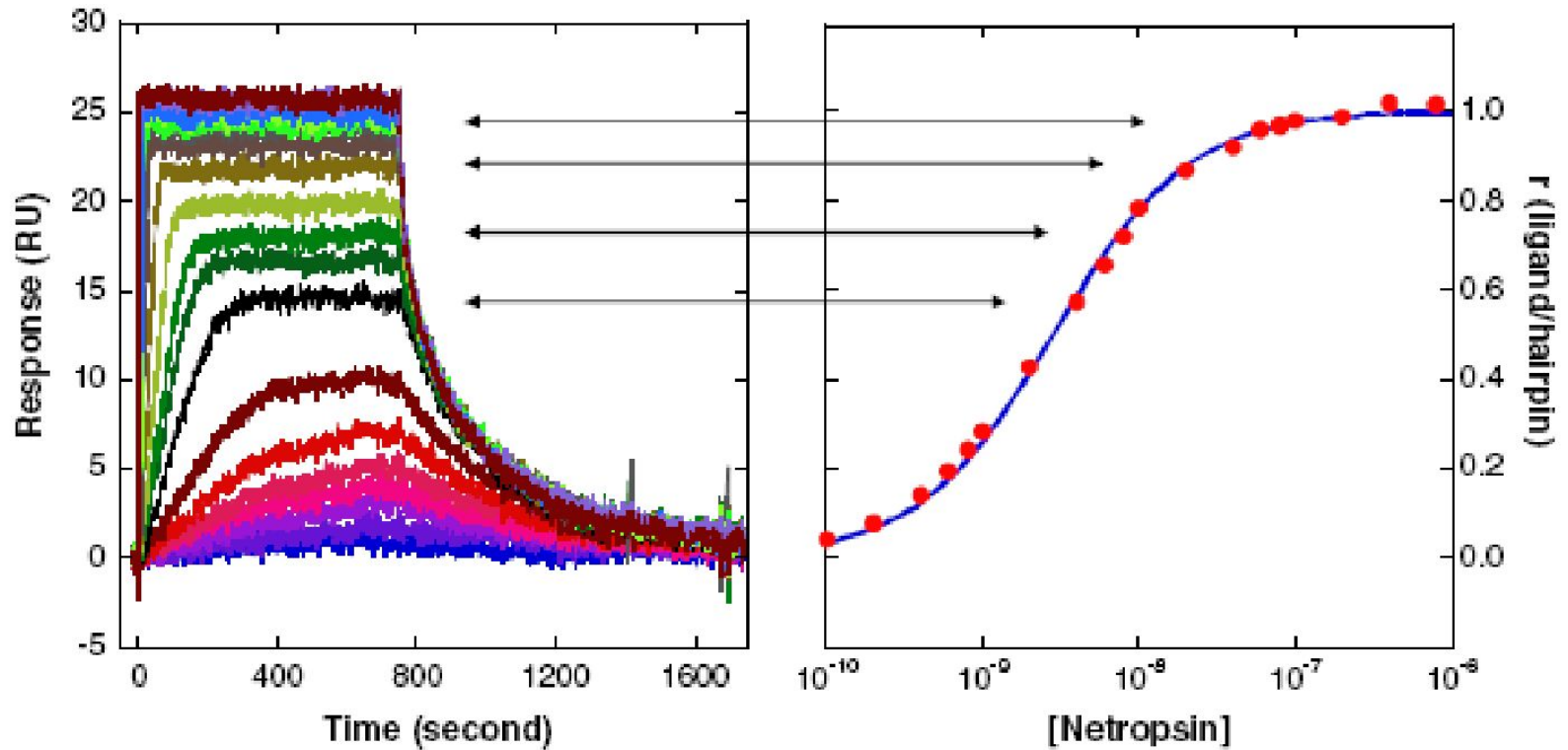
$(dn/dc)_{\text{L}}/(dn/dc)_{\text{D}}$: refractive index increment ratio

r = moles bound ligand/moles DNA or

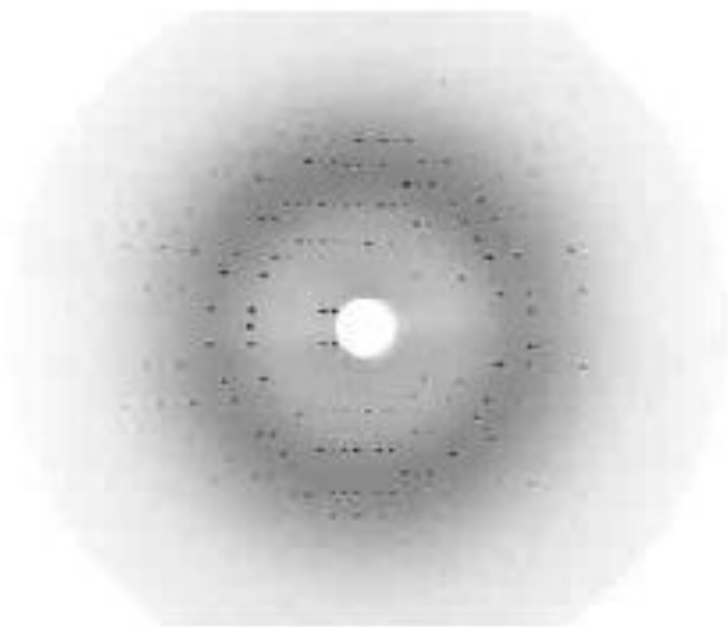
$r = RU_{\text{obs}}/RU_{\text{pred-max}}$.

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

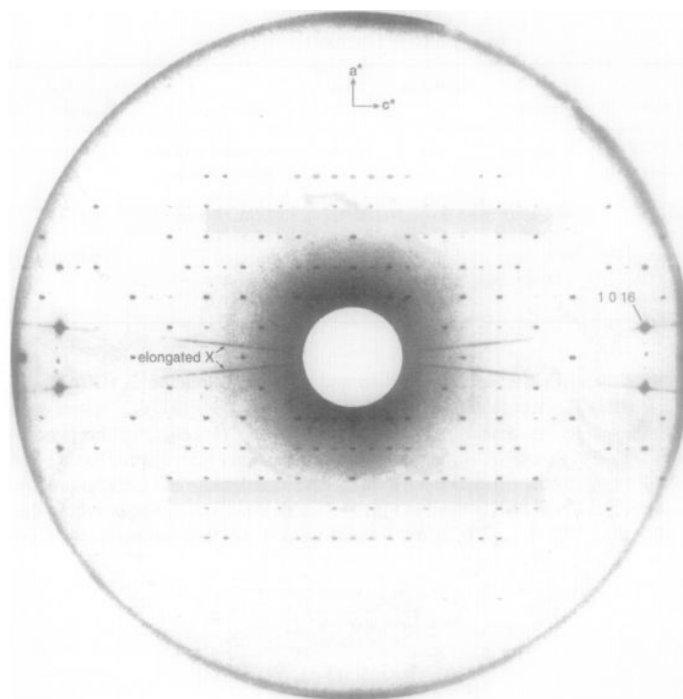
Сенсограмма



Примеры рентгенограмм (дифракционных картин)



Белок



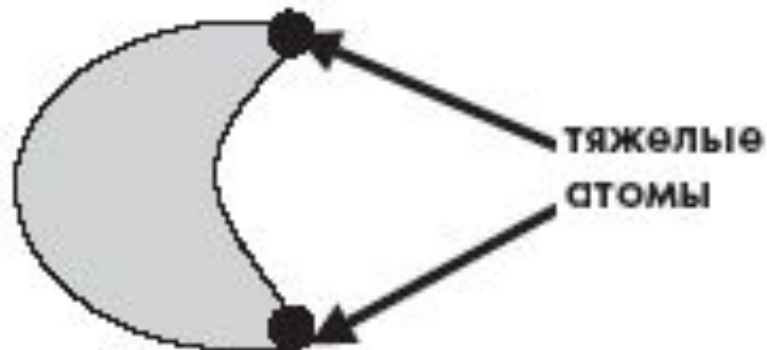
ДНК-порфирин

Изоморфное замещение

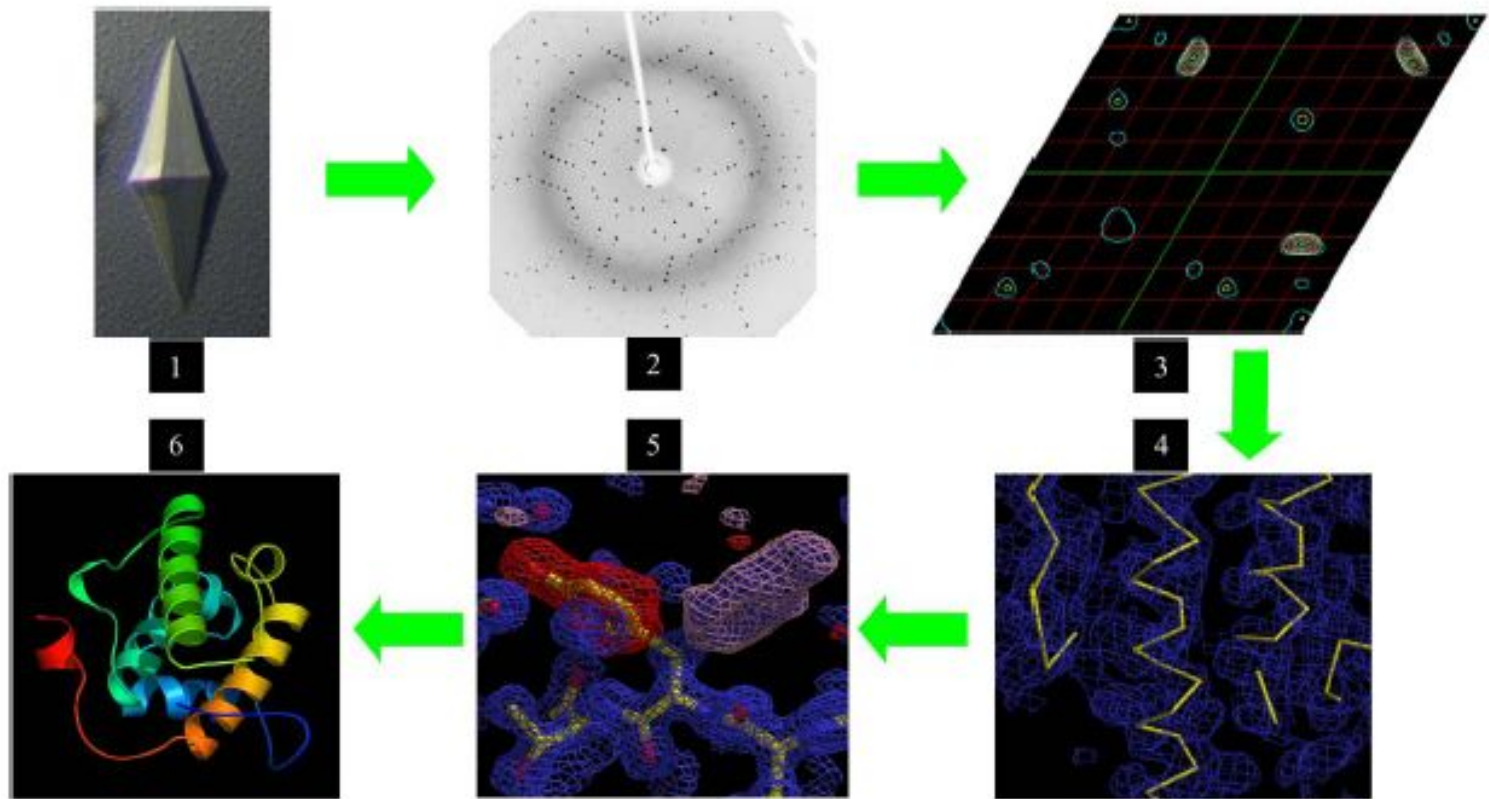
нативный белок



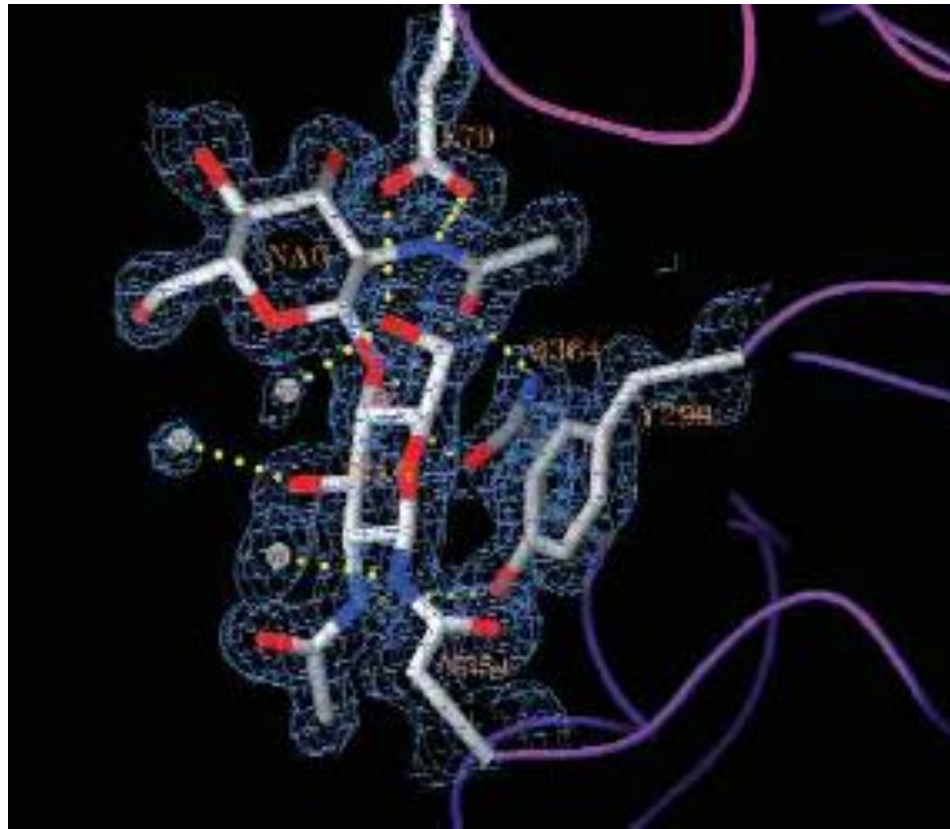
изоморфное производное



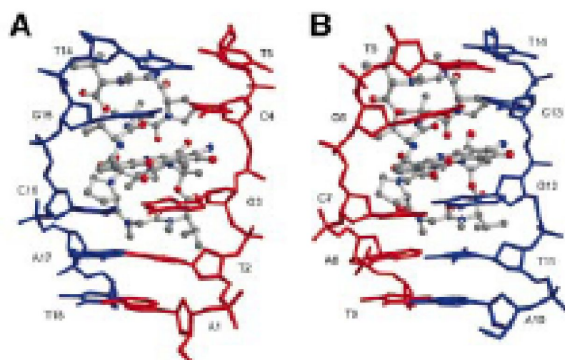
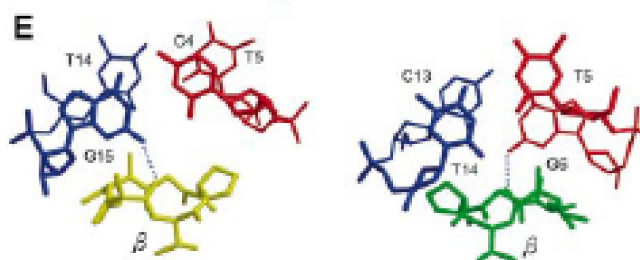
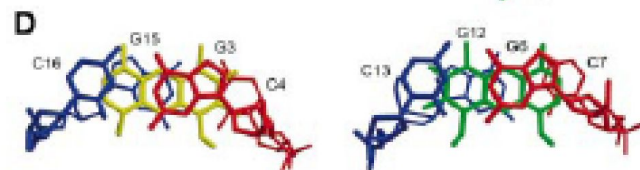
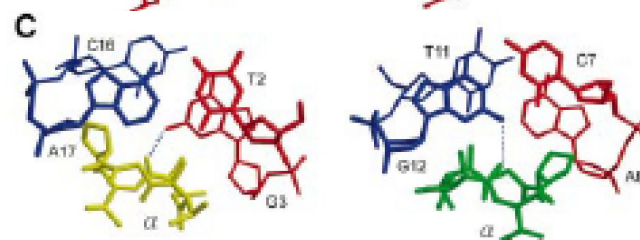
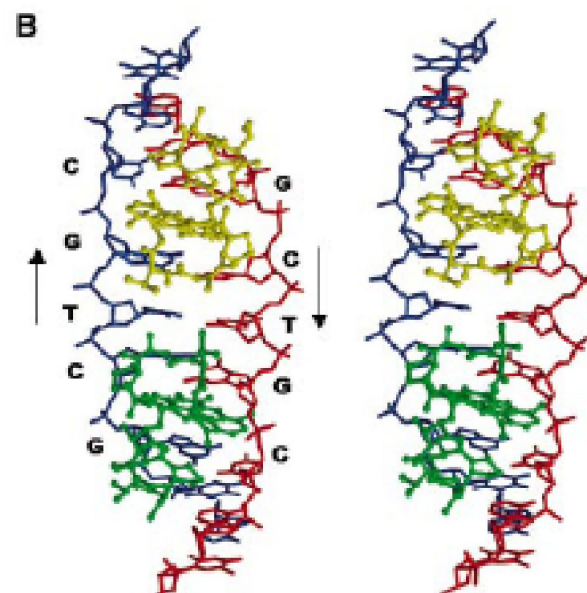
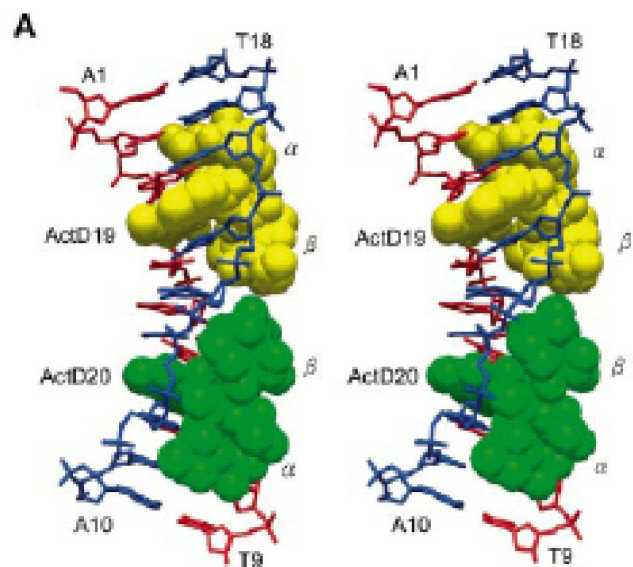
Процесс определения структуры белка по дифракции на одиночном кристалле и использованию явления аномального рассеяния



Пример модели, вписанной в карту электронной плотности



Кристаллическая структура комплекса ДНК-актиномицинD



Кристаллическая структура комплекса ДНК с дисахаридными антрациклинами

