

Wybrane Zagadnienia Biofizyki Molekularnej

(1100-5BM15)

Jan M. Antosiewicz

**Zakład Biofizyki
Instytut Fizyki Doświadczalnej
Wydział Fizyki**

WKŁAD 11

12 listopada, 2024

**Kinetyka biomolekularna
(metody relaksacyjne, E-jump - część 1)**

<http://www.fuw.edu.pl/~jantosi/>

jantosi@fuw.edu.pl

Pomiary elektrooptyczne dotyczą obserwacji zachodzących zmian właściwości optycznych w wyniku przyłożenia zewnętrznego pola elektrycznego. Najczęściej mierzone są dwójłomność (efekt Kerra), dichroizm, efekty rozpraszania światła i fluorescencji w próbkach poddanych impulsom pola elektrycznego. [C. Houssier, Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects 148 (1999) 3-8].

Dwójłomność to właściwość optyczna materiału o współczynniku załamania światła zależnym od polaryzacji i kierunku propagacji światła. Dwójłomność jest odpowiedzialna za zjawisko podwójnego załamania, w wyniku którego promień światła padający na materiał dwójłomny zostaje rozdzielony przez polaryzację na dwa promienie, promień zwyczajny i promień niezwykły, poruszające się nieco różnymi drogami.

Dwójłomność elektryczna, zwana także efektem Kerra, to zmiana współczynnika załamania światła materiału w odpowiedzi na przyłożone pole elektryczne.

Przejściowa dwójłomność elektryczna to chwilowa dwójłomność elektryczna powstająca w wyniku przyłożenia impulsu pola elektrycznego.

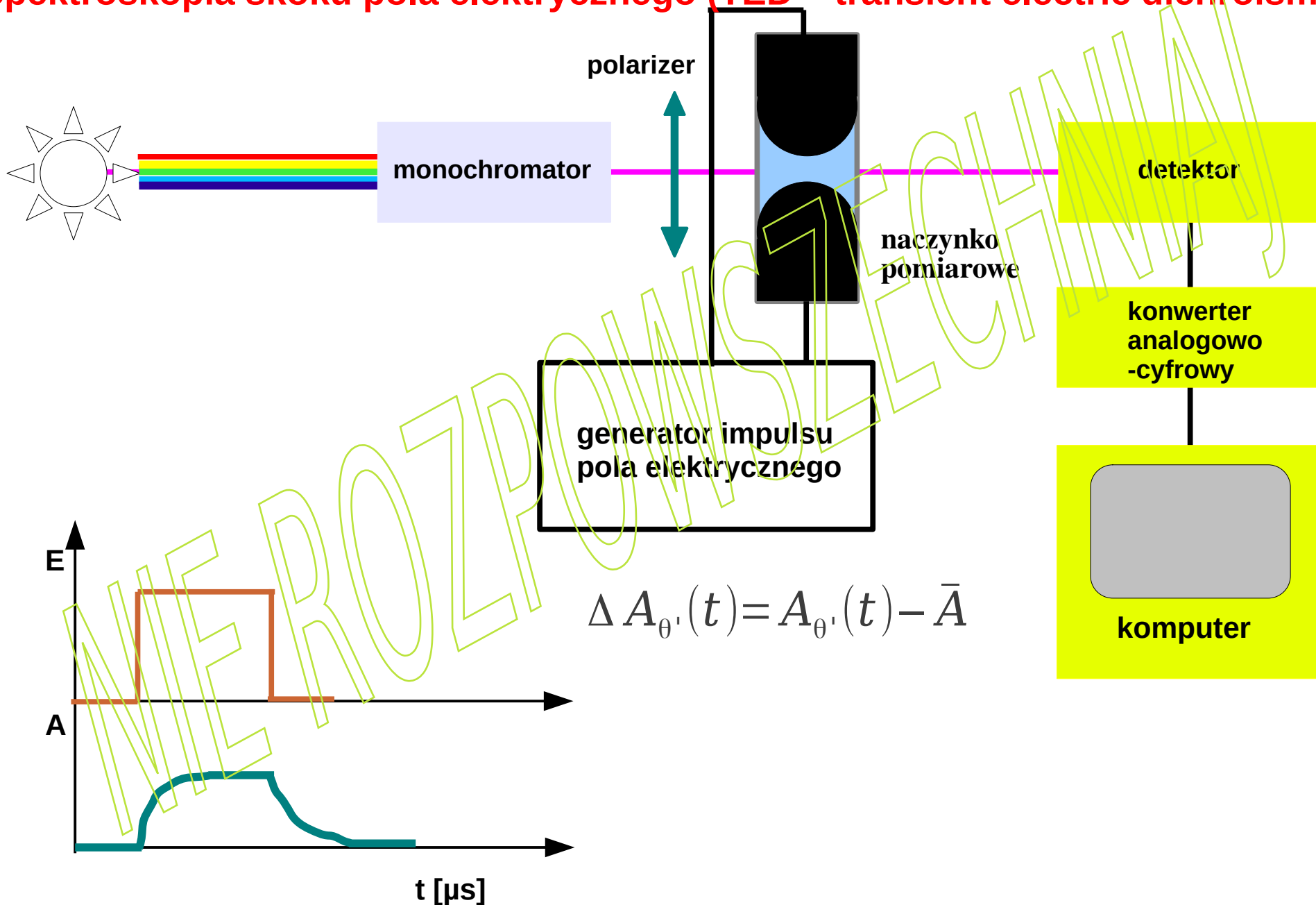
Dichroizm to właściwość optyczna materiału, którego absorpcja zależy od polaryzacji światła. Dichroizm odpowiada za różną absorpcję promieni zwyczajnych i nadzwyczajnych w kryształach anizotropowych.

Dichroizm liniowy (LD) lub diatenuacja to różnica między absorpcją światła spolaryzowanego równoległe i spolaryzowanego prostopadle do osi orientacji.

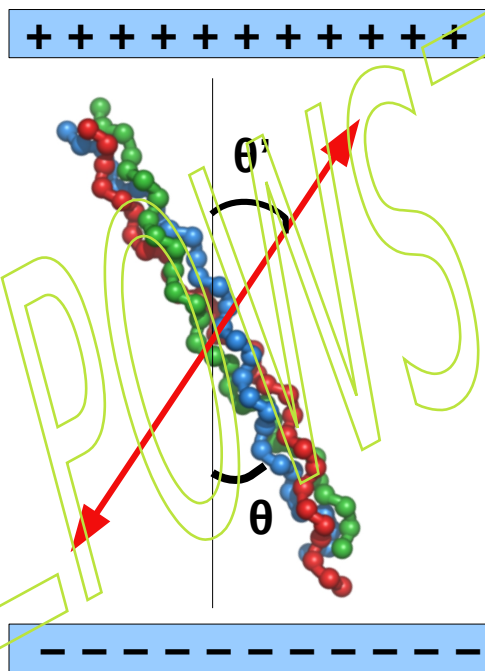
Dichroizm elektryczny to dichroizm liniowy powstający w wyniku przyłożenia pola elektrycznego.

Przejściowy dichroizm elektryczny to przejściowy dichroizm liniowy powstający w wyniku przyłożenia impulsu pola elektrycznego.

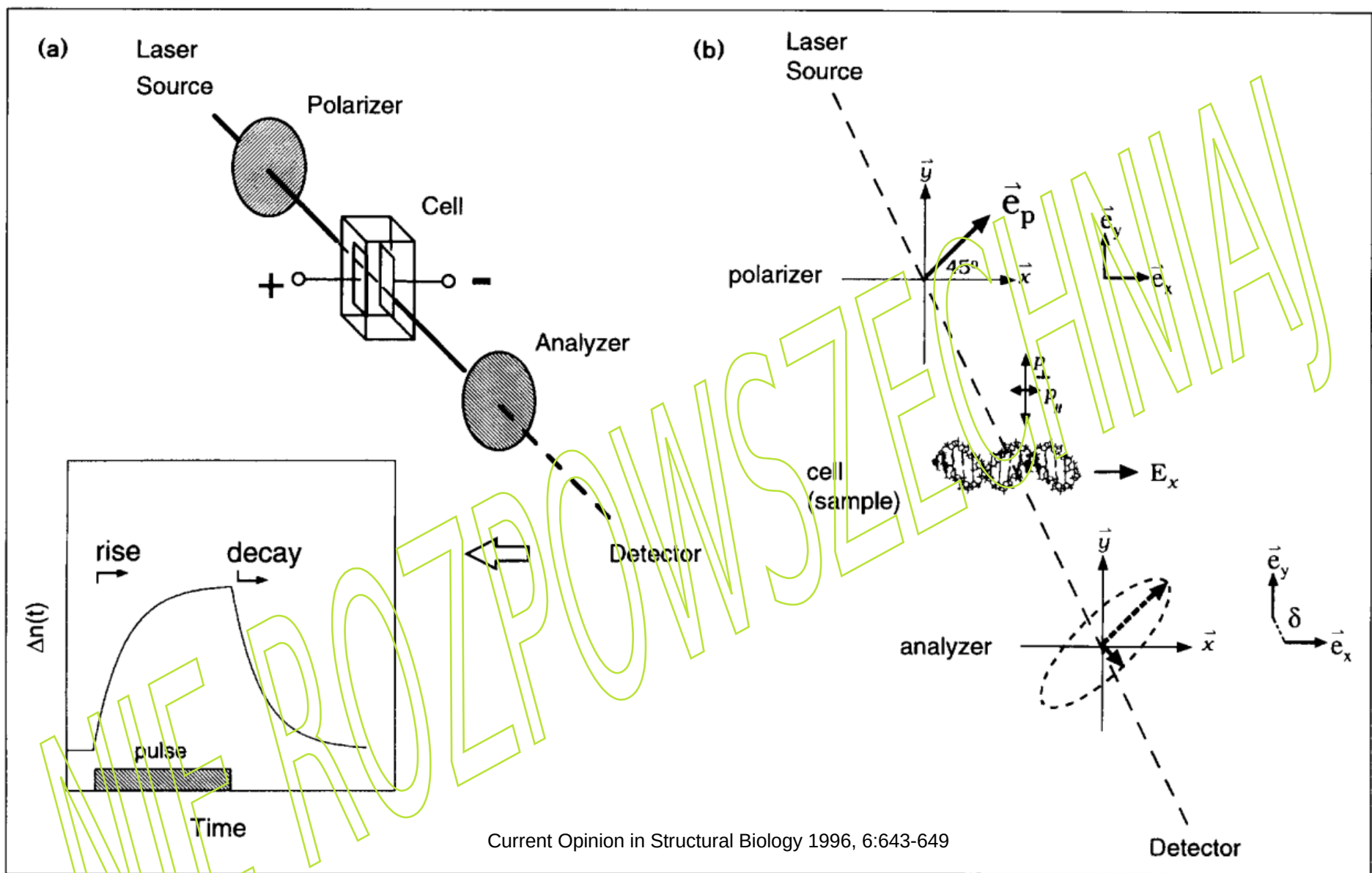
Spektroskopia skoku pola elektrycznego (TED – transient electric dichroism)



Układ eksperymentalny wprowadza symetrię cylindryczną wokół naczynka pomiarowego spektrometru, zatem absorpcja A jest funkcją tylko czasu t i kąta θ' pomiędzy płaszczyzną polaryzacji padającego światła a kierunkiem zewnętrznego pola elektrycznego. Wyprowadzamy zależność od θ' przy założeniu cylindrycznych cząsteczek w roztworze.

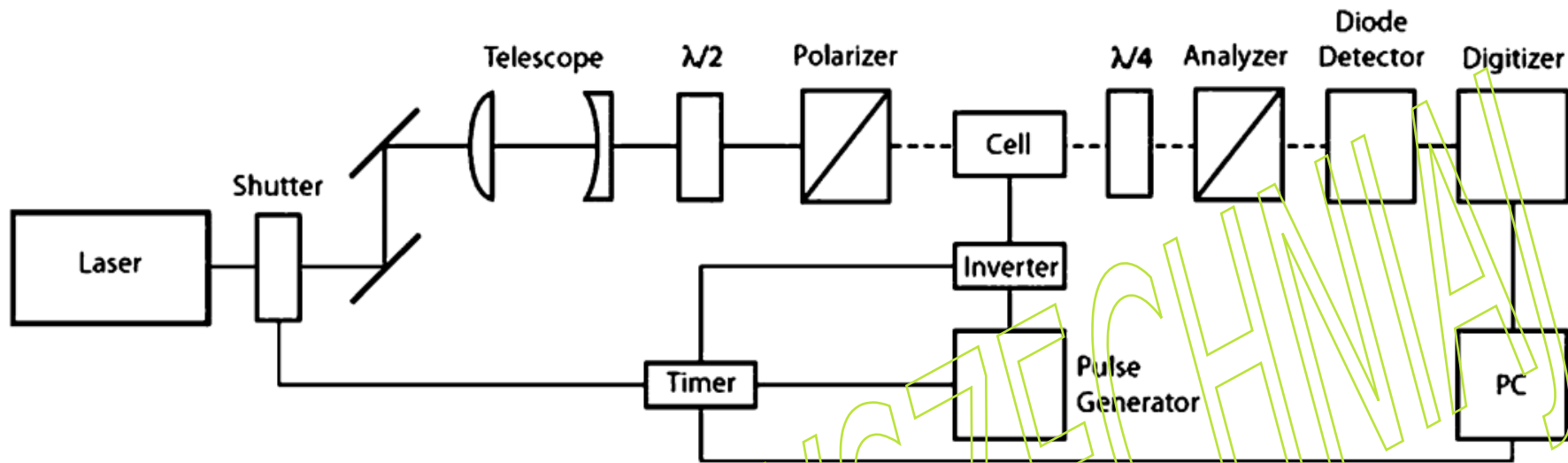


Wykażemy również, że mierzony sygnał absorpcji A zależy od średniego kąta θ pomiędzy osią cząsteczki (kierunkiem momentu przejścia) a kierunkiem zewnętrznego pola elektrycznego.



Current Opinion in Structural Biology 1996, 6:643-649

Zarys podstawowego eksperymentu TEB (a) i źródła indukcji dwójłomności (b). Światło (e_p) spolaryzowane pod kątem 45° względem do osi anizotropii orientacyjnej (x , E_x) można rozłożyć na składowe (e_y, e_x), które są odpowiednio prostopadłe i równoległe do osi anizotropii. Przechodząc przez częściowo zorientowaną próbkę, składowki te napotykają różną polaryzowalność molekularną (i w konsekwencji propagują z różnymi prędkościami), przy czym większe opóźnienie występuje w płaszczyźnie o większej polaryzowalności (większy współczynnik załamania światła). W rezultacie oba składowki ulegają niewielkiemu przesunięciu fazowemu (δ); e_p można zatem przedstawić jako wiązkę spolaryzowaną eliptycznie z małą składową w kierunku transmisji analizatora. W tej podstawowej konfiguracji instrumentalnej światło będzie przepuszczane przez analizator pod kątem dodatniej lub ujemnej dwójłomności; jeżeli jednak pomiędzy naczyniem pomiarowym a analizatorem zostanie umieszczona stała płytką opóźniająca, można wywnioskować jaki jest znak dwójłomności.



Standardowy układ do pomiarów dwójłomności elektrycznej: (1) Jako wygodne źródło światła stosuje się lasery. (2) Światło musi być spolaryzowane pod kątem 45° w stosunku do wektora przyłożonego zewnętrznego pola elektrycznego. Jeżeli światło lasera jest spolaryzowane, płaszczyznę polaryzacji można obrócić za pomocą płytki $\lambda/2$ o wymagane 45° i ostatecznie zwiększyć stopień polaryzacji za pomocą polaryzatora. Spolaryzowane światło przechodzi przez naczynko, płytkę $\lambda/4$ z wolną osią równoległą do płaszczyzny polaryzacji polaryzatora, analizator w położeniu prawie skrzyżowanym* i ostatecznie dociera do detektora diodowego.

Regulacja optyki do pomiarów dwójłomności

1. Polaryzator pomiędzy źródłem światła a celką pomiarową należy obrócić o kąt 45° względem wektora pola w kierunku zgodnym z ruchem wskazówek zegara, patrząc od strony źródła światła.
2. W przypadku braku płytki $\lambda/4$ analizator znajdujący się pomiędzy ogniwnem a detektorem należy obrócić w położenie skrzyżowane, odpowiadające minimalnemu natężeniu światła przechodzącego od źródła światła do detektora.
3. Wsuwa się płytkę $\lambda/4$ i obraca ją, aż natężenie światła docierającego do detektora będzie ponownie minimalne; w tej orientacji katowej wolna oś płytki $\lambda/4$ jest równoległa do płaszczyzny polaryzacji polaryzatora.
4. Analizator obraca się z pozycji skrzyżowanej w kierunku płaszczyzny polaryzacji polaryzatora o kąt α ; w tym układzie ujemna dwójłomność próbki powoduje zmniejszenie natężenia światła, natomiast dodatnia dwójłomność powoduje wzrost natężenia światła; kąt α zależy od natężenia dostępnego światła i czułości detektora; do pomiarów ujemnej dwójłomności α dobiera się tak, aby całkowite natężenie światła było blisko górnego końca liniowej domeny odpowiedzi detektora (np. 10% poniżej wartości maksymalnej).

*Skrzyżowane położenie filtrów polaryzacyjnych i analizatorów oznacza, że są one ustawione względem siebie pod kątem 90° .

Pomiar dwójłomności

1. Odczytaj całkowite natężenie światła I_α pod kątem α od pozycji skrzyżowanej.
2. Przyłóż impuls pola elektrycznego i zapisz stan nieustalony indukowany przez pole; odczytaj stacjonarną zmianę natężenia światła ΔI_δ (w przedziale czasu, w którym zmiana osiąga stały poziom).

Zmiana natężenia światła ΔI_δ indukowaną impulsem pola elektrycznego wyraża się wzorem:

$$\frac{\Delta I_\delta}{I_\alpha} = \frac{\sin^2(\alpha + \delta/2) - \sin^2(\alpha)}{\sin^2(\alpha)}$$

I_α jest całkowitym sygnałem świetlnym mierzonym przy braku zewnętrznego pola elektrycznego w pozycji analizatora obróconej o kąt α od pozycji skrzyżowanej. δ jest przesunięciem fazowym lub opóźnieniem optycznym:

$$\delta = \frac{2\pi l \Delta n}{\lambda}$$

gdzie Δn to różnica współczynnika załamania światła, l to długość ścieżki optycznej, a λ to długość fali światła użytego do pomiaru. Przesunięcie fazowe lub opóźnienie optyczne uzyskuje się poprzez:

$$\delta = 2 \times \left(\arcsin \left[\frac{\Delta I_\delta}{I_\alpha} \times \sin^2(\alpha) + \sin^2(\alpha) \right]^{1/2} - \alpha \right)$$

Dwójłomność odpowiadająca różnicy współczynnika załamania roztworu w kierunku równoległym i prostopadłym do przyłożonego pola jest określona wzorem:

$$\Delta n = \frac{\delta \lambda}{2\pi l}$$

Dwójłomność elektryczna a dichroizm elektryczny: zalety i wady

Dwójłomność elektryczna ma pewne zalety w porównaniu z dichroizmem elektrycznym:

- 1. Dwójłomność można mierzyć poza zakresem absorpcji światła, co pozwala uniknąć fotoreakcji.**
- 2. Lasery o dużej intensywności światła i wąskich wiązках światła są bardzo przydatne w celu zwiększenia czułości. Wąskie wiązki światła są niezbędne do budowy naczynek pomiarowych o małej odległości między elektrodami i długich ścieżkach optycznych.**

Jednakże dichroizm elektryczny ma również pewne zalety:

- 1. Sygnały przejściowe dichroizmu elektrycznego nie są zakłócone przez udział rozpuszczalnika. (W roztworach wodnych dwójłomność wody może być stosunkowo duża.)**
- 2. Reakcje wywołane polem można łatwiej wykryć: pomiary pod magicznym kątem wykazują bezpośrednio i selektywnie istnienie takich reakcji.**
- 3. Obliczenia dichroizmu elektrycznego ze znanych struktur molekuł lub modeli są prostsze i jednoznaczne.**

PROBLEMY BADAWCZE ROZWIĄZYWANE METODAMI SKOKU POLA E:

Struktura biopolimerów z rozdzielczością mezoskopową

Strukturalna dynamika of biopolimerów

Wyznaczanie stałych i indukowanych momentów dipolowych biopolimerów

Wyznaczanie współczynników dyfuzji rotacyjnej biopolimerów

Moment dipolowy przejścia ...

... dla przejścia między stanem początkowym i i stanem końcowym f jest elektrycznym momentem dipolowym związanym z przejściem między dwoma stanami. Ogólnie rzecz biorąc, przejściowy moment dipolowy jest złożoną wielkością wektorową, która obejmuje współczynniki fazowe związane z dwoma stanami. Jego kierunek określa polaryzację przejścia, która określa, jak układ będzie oddziaływać z falą elektromagnetyczną o danej polaryzacji, natomiast kwadrat wielkości określa siłę oddziaływania wynikającą z rozkładu ładunku w układzie.

$$\vec{\mu}_{if} = \int \psi_f^* \cdot \vec{\mu} \cdot \psi_i d\tau$$

gdzie:

$$\vec{\mu} = e \cdot \sum_j \vec{r}_j$$

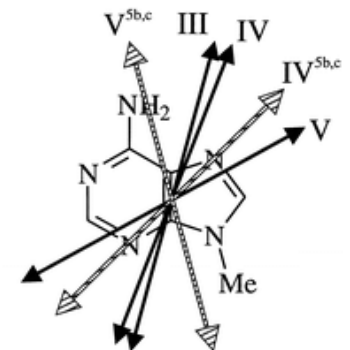
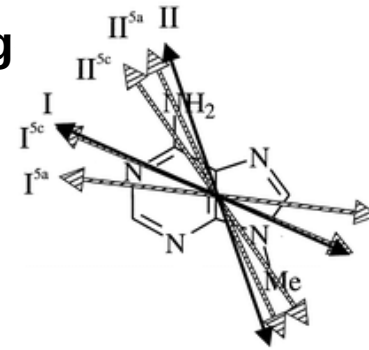
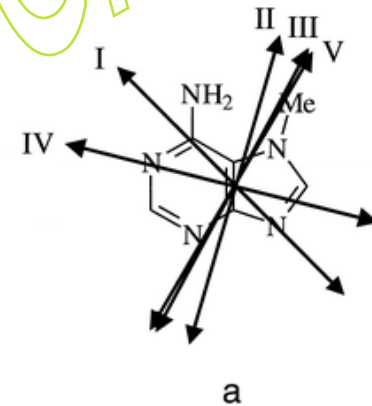
- operator momentu dipolowego chromofora

$$\psi_i \quad i \quad \psi_f$$

- funkcje falowe stanu początkowego i końcowego, odpowiednio

$$\vec{r}_j$$

- wektor położenia j-tego elektronu



Absorpcja spolaryzowanego liniowo światła przez molekuly cylindryczne

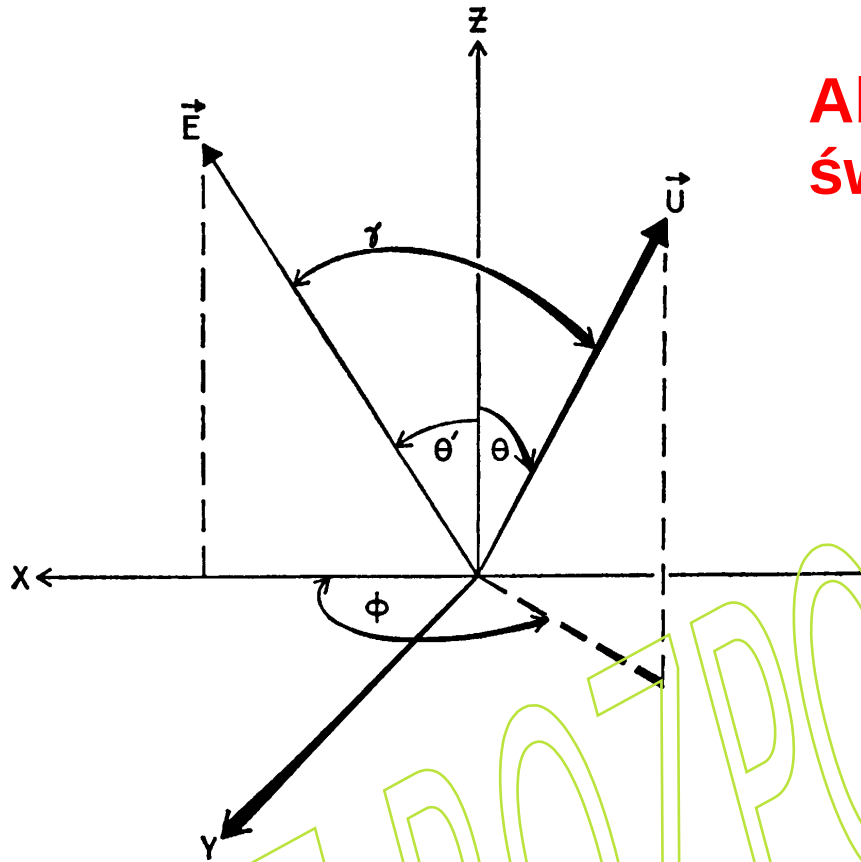


FIGURE 1 Geometric relationship of radiation incident on a rod perfectly oriented along the Z axis with transition moment \vec{U} at angles θ , ϕ . The direction of propagation of the light wave is the Y axis; \vec{E} is polarized at an arbitrary angle θ' . γ is the angle between \vec{E} and \vec{U} .

Absorpcja światła przez chromofor jest proporcjonalna do kwadratu iloczynu skalarnego wektora elektrycznego światła i wektora momentu przejścia:

$$(\vec{E} \cdot \vec{U})^2 = E^2 U^2 \cos^2 \gamma$$

Kiedy chromofor tworzy kąty θ i ϕ z laboratoryjnym układem współrzędnych (LCS), a wektor światła tworzy kąty odpowiednio θ' i ϕ' , to

$$\vec{U} = U \sin \theta \cos \phi \cdot \vec{e}_x + U \sin \theta \sin \phi \cdot \vec{e}_y + U \cos \theta \cdot \vec{e}_z$$

$$\vec{E} = E \sin \theta' \cos \phi' \cdot \vec{e}_x + E \sin \theta' \sin \phi' \cdot \vec{e}_y + E \cos \theta' \cdot \vec{e}_z$$

$$\cos \gamma = \sin \theta \sin \theta' (\cos \phi \cos \phi' + \sin \phi \sin \phi') + \cos \theta \cos \theta' = \cos \theta \cos \theta' + \sin \theta \sin \theta' \cos(\phi - \phi')$$

Dla światła rozchodzącego się wzdłuż osi Oy, $\varphi'=0$ i średnią absorpcję otrzymuje się z uśrednienia po wszystkich kątach φ :

$$\int A(\theta, \theta', \phi) d\phi = \frac{K}{2\pi} \int_0^{2\pi} \cos^2 \gamma d\phi$$

gdzie K jest stałą współczynnikiem proporcjonalności, a 2π jest dodane w celach normalizacji. Zatem

$$A(\theta, \theta') = K \left(\cos^2 \theta \cos^2 \theta' + \frac{1}{2} \sin^2 \theta \sin^2 \theta' \right)$$

Gdy cząsteczki są doskonale zorientowane względem zewnętrznego pola elektrycznego, absorpcja A jest funkcją orientacji płaszczyzny polaryzacji padającego światła θ' i orientacji wektora momentu przejścia względem głównej osi cząsteczki (poprzez stałą proporcjonalności K). Obliczenie pierwszej pochodnej A względem θ' daje ekstrema A dla $\theta' = 0^\circ$ i $\theta' = 90^\circ$, niezależnie od kąta θ :

$$\frac{\partial A(\theta, \theta')}{\partial \theta'} = K \cdot \sin \theta' \cos \theta' (\sin^2 \theta - 2 \cos^2 \theta) \quad \frac{\partial A(\theta, \theta')}{\partial \theta'} = 0 \Rightarrow \theta' = 0 \vee \theta' = \frac{\pi}{2}$$

Dla $\theta'=0$ mamy:

$$A(\theta, 0) = K \cdot \cos^2 \theta \equiv A_{\parallel}$$

i dla $\theta'=90$ mamy:

$$A(\theta, \pi/2) = \frac{1}{2} K \cdot \sin^2 \theta \equiv A_{\perp}$$

zatem, zachowując jedynie jawną zależność A od kąta θ' , możemy zapisać:

$$A(\theta, \theta') = K \cdot \left(\cos^2 \theta \cos^2 \theta' + \frac{1}{2} \sin^2 \theta \sin^2 \theta' \right) \Rightarrow A(\theta') = A_{\parallel} \cdot \cos^2 \theta' + A_{\perp} \cdot \sin^2 \theta'$$

niezależnie od kąta θ , czyli niezależnie od aktualnej orientacji cząsteczek w naczynku pomiarowym względem kierunku pola zewnętrznego (obowiązuje tylko wtedy, gdy pole nie powoduje żadnych zmian chemicznych)

Możemy obliczyć średnią absorpcję (współczynnik $\frac{1}{2}$ to współczynnik normalizacji, $\int_0^{\pi} \sin \theta' d\theta' = 2$):

$$\bar{A} = \frac{1}{2} \int_0^{\pi} (A_{\parallel} \cdot \cos^2 \theta' + A_{\perp} \cdot \sin^2 \theta') \sin \theta' d\theta' = \frac{A_{\parallel} + 2 A_{\perp}}{3}$$

Możemy sprawdzić, że:

$$\frac{A_{\parallel} + 2 A_{\perp}}{3} = \frac{K \cdot \cos^2 \theta + 2 \cdot \frac{1}{2} \cdot K \cdot \sin^2 \theta}{3} = \frac{K}{3}$$

Liniowy dichroizm jest zdefiniowany jako:

$$LD = A_{\parallel} - A_{\perp}$$

możemy wprowadzić zredukowany dichroizm liniowy:

$$\xi = \frac{A_{\parallel} - A_{\perp}}{\bar{A}}$$

Korzystając ze wzoru na średnią absorpcję z poprzedniego slajdu, obowiązującego, gdy pole elektryczne nie powoduje zmian chemicznych w roztworze, mamy:

$$\text{If } \bar{A} = \frac{A_{\parallel} + 2A_{\perp}}{3} \Rightarrow \xi = \frac{3A_{\parallel} - \bar{A}}{2\bar{A}} \equiv \frac{3\Delta A_{\parallel}}{2\bar{A}}$$

Ponadto:

$$\Delta A_{\parallel} = A_{\parallel} - \bar{A} = 3\bar{A} - 2A_{\perp} - \bar{A} = -2(A_{\perp} - \bar{A}) = -2\Delta A_{\perp}$$

Ogólnie rzecz biorąc, nie mierzymy bezpośrednio dichroizmu elektrycznego, ale w rzeczywistości mierzymy:

$$\Delta A_{\theta'}(t) = A_{\theta'}(t) - \bar{A}$$

wprowadzając:

$$A_{\theta'}(t) = A_{\parallel}(t) \cdot \cos^2 \theta' + A_{\perp}(t) \cdot \sin^2 \theta' \quad i \quad \forall_t \quad \bar{A} = \frac{A_{\parallel}(t) + 2A_{\perp}(t)}{3}$$

mamy:

$$\Delta A_{\theta'}(t) = A_{\parallel}(t) \cdot \cos^2 \theta' + A_{\perp}(t) \cdot \sin^2 \theta' - \bar{A} \quad \Delta A_{\theta'}(t) = A_{\parallel}(t) \cdot \cos^2 \theta' + \frac{3\bar{A} - A_{\parallel}(t)}{2} \cdot \sin^2 \theta' - \bar{A}$$

$$\Delta A_{\theta'}(t) = \frac{2A_{\parallel}(t) \cdot \cos^2 \theta' + (3\bar{A} - A_{\parallel}(t)) \cdot \sin^2 \theta' - 2\bar{A}}{2}$$

$$\Delta A_{\theta'}(t) = \frac{2A_{\parallel}(t) \cdot \cos^2 \theta' + 3\bar{A} \cdot (1 - \cos^2 \theta') - A_{\parallel}(t) \cdot (1 - \cos^2 \theta') - 2\bar{A}}{2}$$

lub:

$$\Delta A_{\theta'}(t) = \frac{3(A_{\parallel}(t) - \bar{A}) \cdot \cos^2 \theta' - (A_{\parallel}(t) - \bar{A})}{2} = \frac{A_{\parallel}(t) - \bar{A}}{2} \cdot (3 \cos^2 \theta' - 1) \equiv \frac{\Delta A_{\parallel}(t)}{2} \cdot (3 \cos^2 \theta' - 1)$$

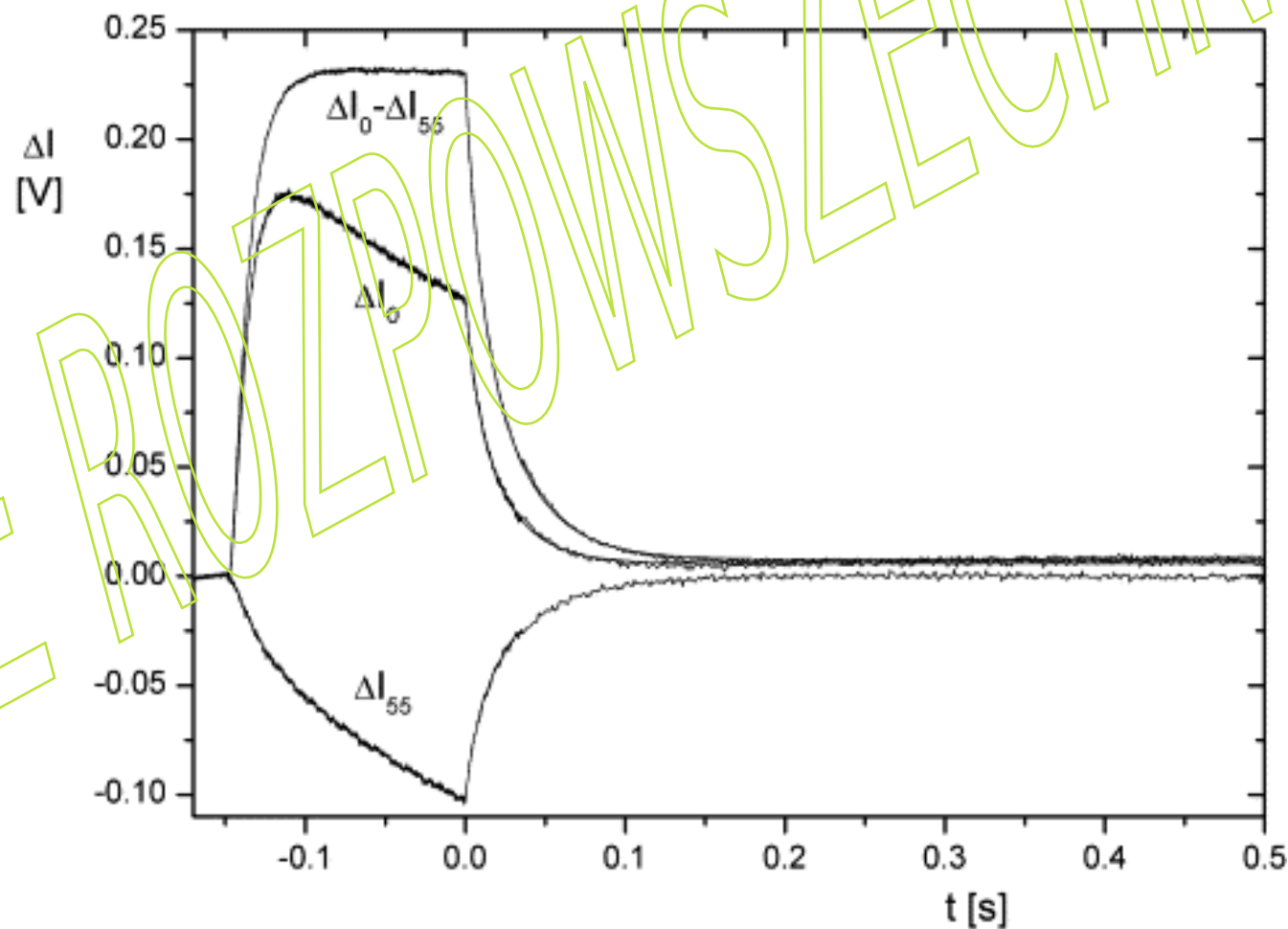
$$\Delta A_{\theta'}(t) = -\Delta A_{\perp}(t) \cdot (3 \cos^2 \theta' - 1)$$

Istnieje szczególny kąt θ' , dla którego:

$$3\cos^2\theta' - 1 = 0$$

Kąt wynosi $54,8^\circ$. Gdy pole elektryczne nie inicjuje żadnej reakcji chemicznej, niezależnie od $\Delta A_{\parallel}(t)$, nie obserwujemy żadnego sygnału pod kątem $54,8^\circ$. Innym wskazaniem braku inicjacji reakcji jest:

$$\Delta A_{\parallel} = -2\Delta A_{\perp}$$



Kinetyka konwersji DNA B do A w eksperymentach skoku pola elektrycznego:

Dynamics of the B-A transition of DNA double helices

Davis Jose and Dietmar Porschke

Nucleic Acids Research, 32:2251-2258 (2004)

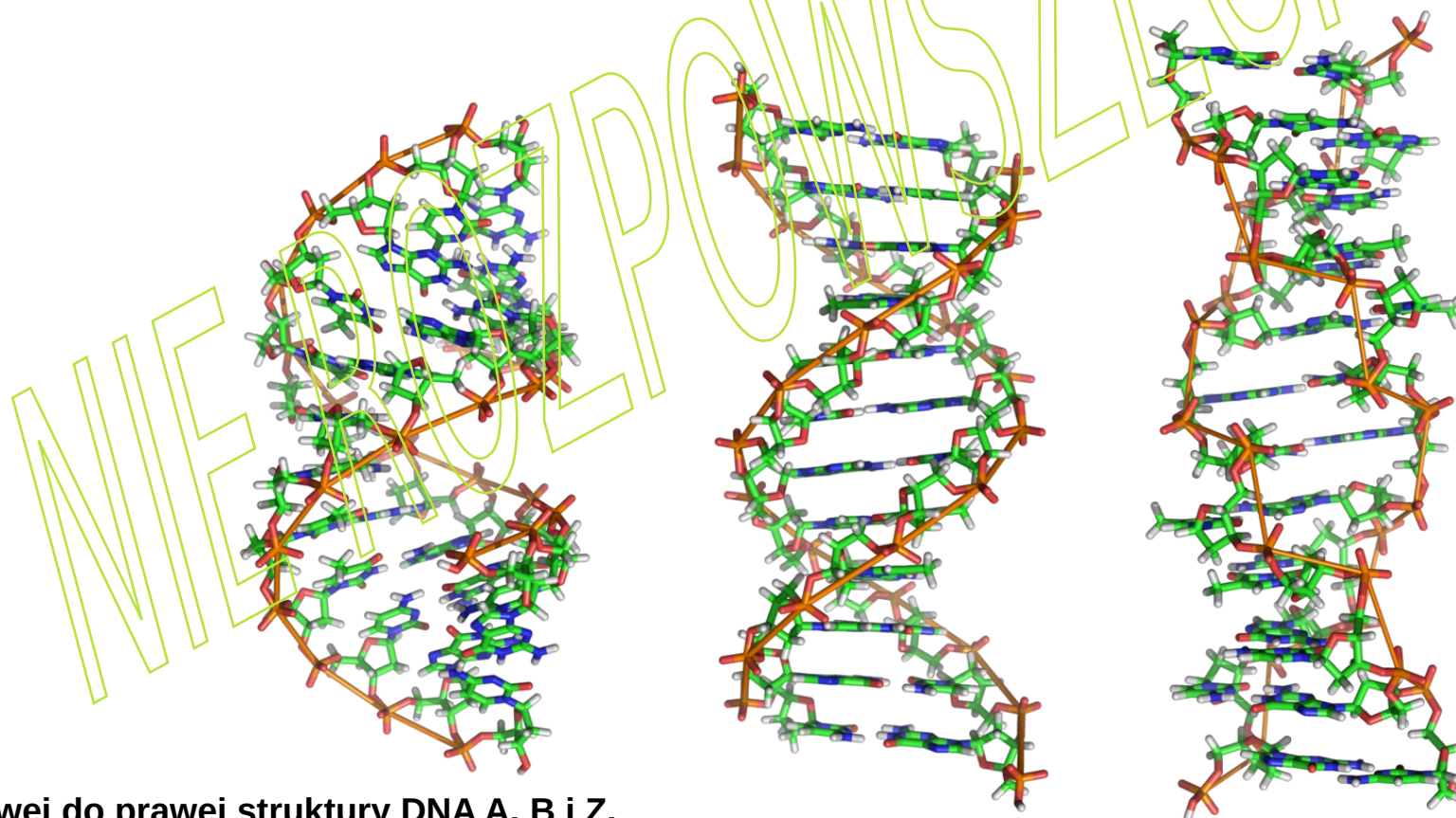
Scopus 2024-11-10: cytowane w 45 publikacjach (włączając Kovaleva i współp., ACS Omega 2020)

The Dynamics of the B-A Transition of Natural DNA Double Helices

Davis Jose and Dietmar Porschke

J. Am. Chem. Soc., 127:16120-16128 (2005)

Scopus 2024-11-10: cytowane w 29 publikacjach (włączając Kovaleva i współp., ACS Omega 2020)



Od lewej do prawej struktury DNA A, B i Z.

Konformacja, jaką przyjmuje DNA, zależy od poziomu uwodnienia, sekwencji DNA, stopnia i kierunku superskręcenia, modyfikacji chemicznych zasad, rodzaju i stężenia jonów metali, a także obecności poliamin w roztworze.

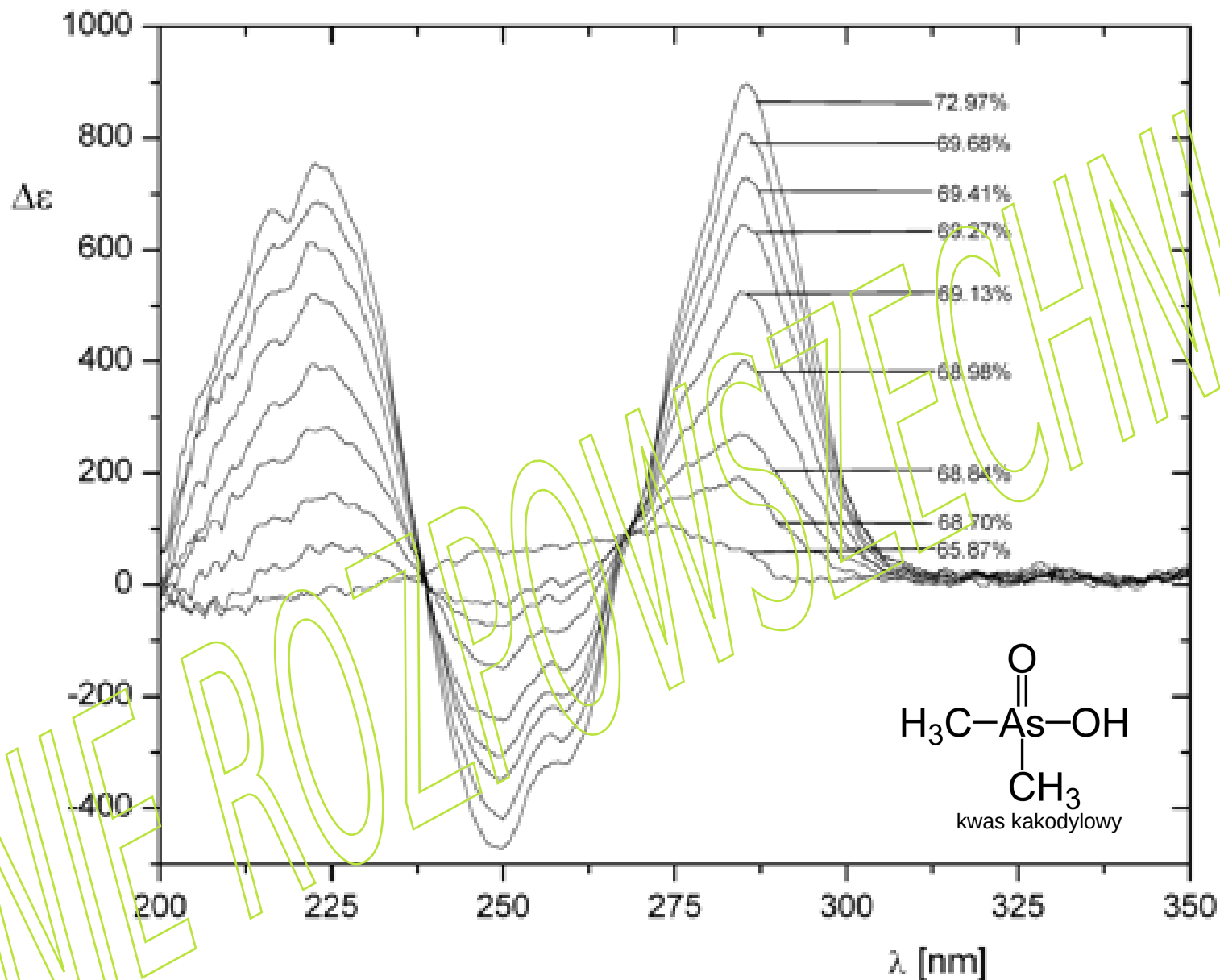
Chociaż forma B-DNA występuje najczęściej w warunkach panujących w komórkach, nie jest to dobrze zdefiniowana konformacja, ale rodzina powiązanych konformacji DNA, które występują przy wysokim poziomie nawodnienia obecnym w żywych komórkach.

A-DNA jest prawoskrętną podwójną helisą, dość podobną do bardziej powszechnej i dobrze znanej formy B-DNA, ale z krótszą, bardziej zwartą strukturą helikalną. Wydaje się prawdopodobne, że występuje ono jedynie w odwodnionych próbkach DNA, takich jak te stosowane w eksperymentach krystalograficznych, i prawdopodobnie występuje także w hybrydowych helisach DNA-RNA oraz w regionach dwuniciowego RNA.

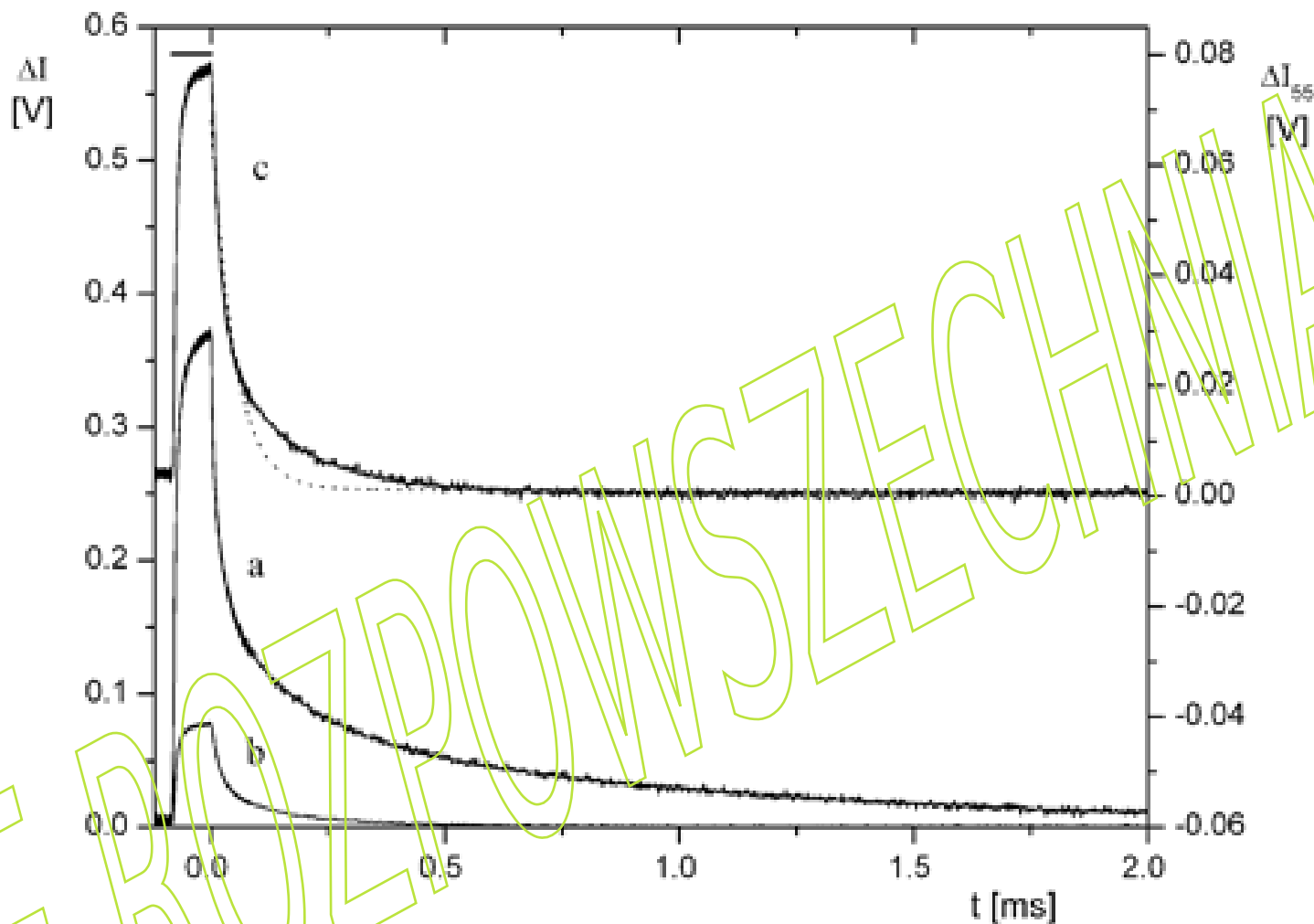
Z-DNA to lewoskrętna struktura o podwójnej helisie, w której podwójna helisa wije się w lewo w sposób zygzakowaty.

<http://en.wikipedia.org/wiki/DNA>

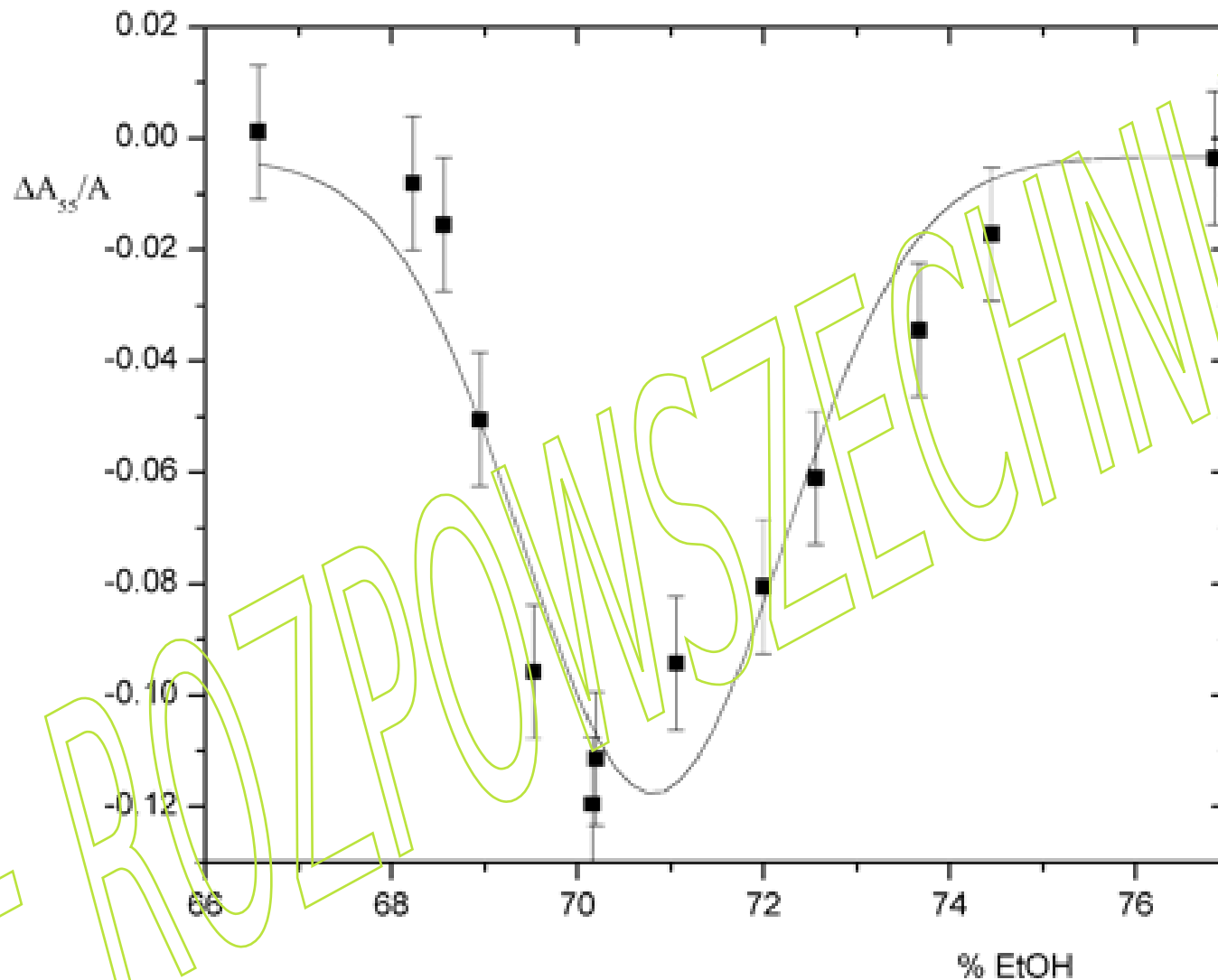
Przejście pomiędzy standardową formą B podwójnych helis DNA a formą A zaobserwowano podczas pierwszych badań rentgenowskich (1-4). Minęło pięćdziesiąt lat, a dynamika tego przejścia nadal nie została scharakteryzowana, mimo że wiadomo, że przejście B-A jest niezbędne do przetwarzania informacji genetycznej (5-9), m.in. podczas transkrypcji (9).



Przejście B-A poli[d(A-T)] (średnia długość 1600 bp) śledzone poprzez widma różnicowe absorpcji przy różnych stężeniach etanolu. Widmo absorpcji zmierzone przy 51,68% etanolu odejmowano od widm absorpcji zmierzonych przy danym stężeniu etanolu. $\Delta\epsilon$ w $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$; % w jednostkach v/v; początkowe stężenia: 40 μM poli[d(A-T)], 125 μM NaCl, 125 μM bufor kakodylowy pH 7, 25 μM EDTA.

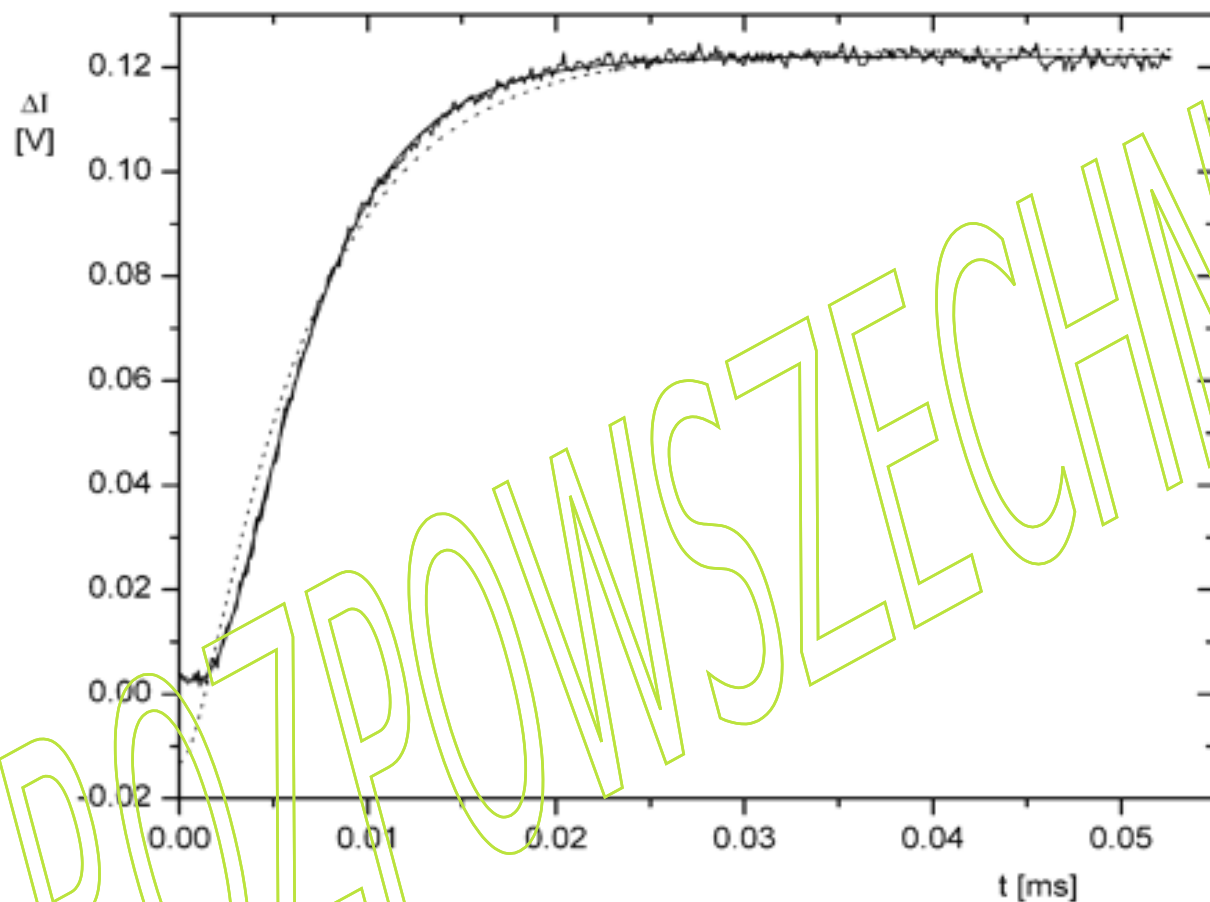


Zmiana transmisji ΔI przy 280 nm, wywołana skokiem pola E, dla poli[d(A-T)]. (a) Skorygowany dichroizm przejściowy ($\Delta I_0 - \Delta I_{55}$, lewa skala); (b) dichroizm przejściowy przy kącie magicznym (ΔI_{55} , średnia z pięciu strzałów, lewa skala); oraz (c) powiększony dichroizm przejściowy przy kącie magicznym (prawa skala). Kreska w lewym górnym rogu wskazuje czas trwania impulsu pola. Dopasowania metodą najmniejszych kwadratów zaniku sygnału przy kącie magicznym (c) przez sumę dwóch eksponensów (17,5 i 145 μ s przy amplitudach względnych odpowiednio 61 i 39%) oraz zaniku dichroizmu (a) przez sumę czterech eksponensów (2,25 μ s, 22,2 μ s, 165 μ s i 1 ms z amplitudami względными odpowiednio 22, 30, 27 i 21%) są nieodróżnialne od danych eksperymentalnych; jednoeksponencjalne dopasowanie (49 μ s) do zaniku sygnału przy kącie magicznym pokazano linią przerywaną. Warunki: 70.2% etanol v/v, 8°C, 8.5 μ M poly[d(A-T)], 75 μ M NaCl, 75 μ M bufor kakodylanowy, pH 7, 15 μ M EDTA; puls pola E 3.45×10^6 V/m.

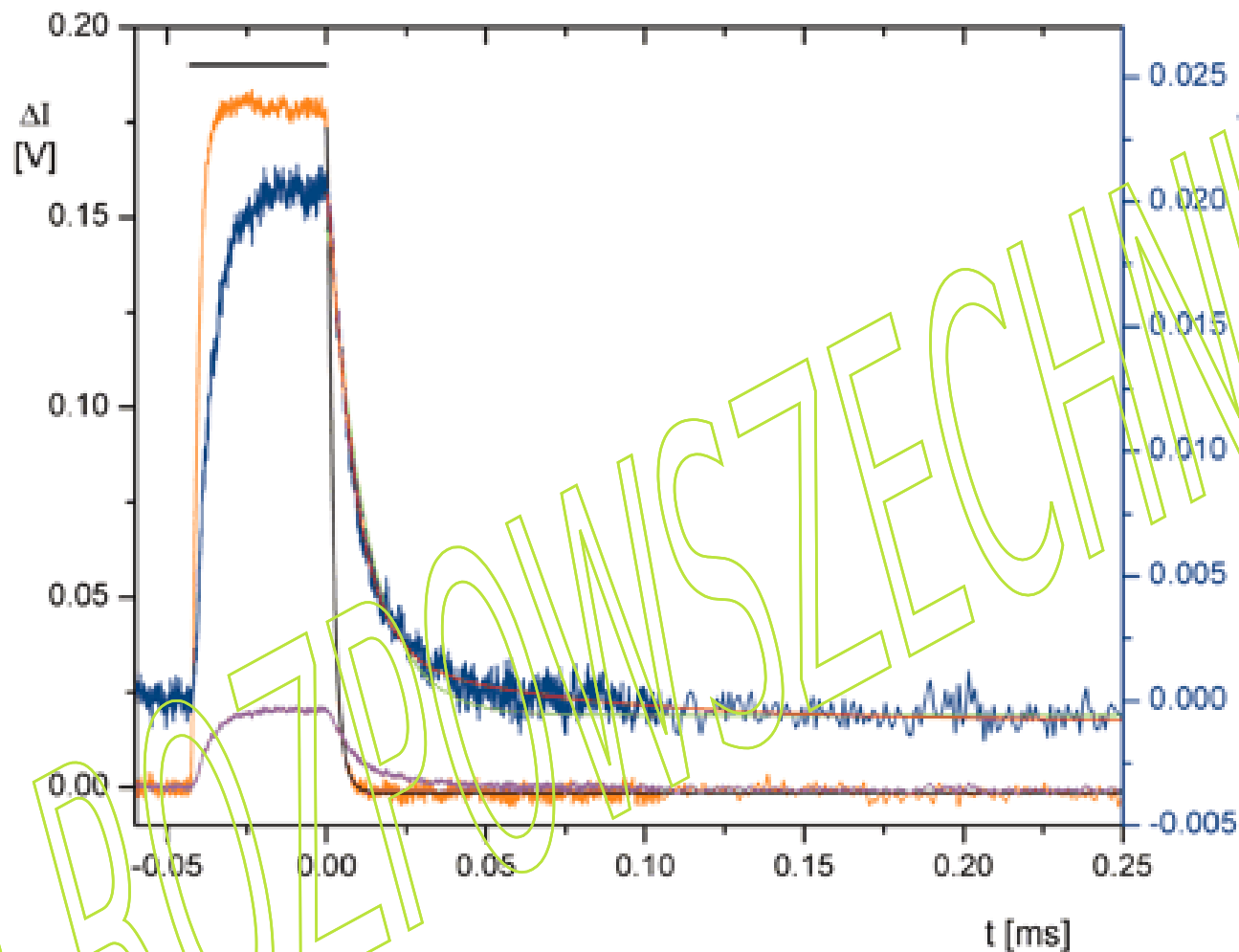


Względne amplitudy relaksacyjne sygnałów przejściowych rejestrowanych przy kącie magicznym, $\Delta A_{55}/A$ dla poly[d(A-T)] jako funkcje stężenia etanolu w procentach objętościowych %(v/v). Linia ciągła przedstawia fitowanie funkcji Gaussa. Warunki: 8°C, 8.5 μM poly[d(A-T)], 75 μM NaCl, 75 μM bufor kakodylanowy, pH 7, 15 μM EDTA; impuls pola E 3.45×10^6 V/m.

Preferencja formy B w obecności pola elektrycznego wskazuje, że helisy formy B mają większy efektywny moment dipolowy. Wiadomo, że momenty dipolowe DNA silnie rosną ze wzrostem długości helisy DNA. Przyrost długości helisy na parę zasad formy B-DNA (3.4 Å) jest znacznie większy niż przyrost na parę zasad w formie A-DNA (~2.8 Å).



Przesuwanie równowagi w stronę formy B przez pole elektryczne wynika z faktu, że moment dipolowy formy B jest większy niż moment dipolowy formy A. Interpretację tę potwierdza przedstawione na powyższym wykresie narastanie dichroizmu przy kącie magicznym dla poly[d(A-T)] indukowane przez impuls pola $3.7 \cdot 10^6$ V/m. Fit dwueksponencjalny daje 1.69 i 4.38 μ s, ze względnymi amplitudami -0.85 i 1.85 co świadczy o istnieniu okresu indukcji, odpowiadającemu początkowemu zerowemu nachyleniu krzywej dichroizmu względem osi x. Pierwszy eksponent opisuje narastanie momentu dipolowego, a drugi opisuje przejście A-B. Proces indukcji momentu dipolowego jest spleciony przejściem A→B, co w efekcie daje obserwowaną zależność dichroizmu od czasu.



Eksperymenty z krótkimi fragmentami DNA wykazujące, że w polu elektrycznym następuje zmiana długości: Indukowana przez pole zmiana transmisji światła w 280 nm dla poly[d(A-T)] o długości 70 par zasad, dla orientacji polaryzatora $\theta' = 0^\circ$ i 55° względem kierunku wektora pola E. Kreska w lewym górnym rogu pokazuje czas trwania impulsu pola E. Skorygowany dichroizm przejściowy ($\Delta I_0 - \Delta I_{55}$, pomarańczowy) z linią dopasowania sumy dwóch eksponensów (czarny, $\tau_1 = 0.83 \mu\text{s}$, $\tau_2 = 2.19 \mu\text{s}$, $A_1 = 61\%$, $A_2 = 39\%$); sygnał przejściowy przy kącie magicznym (ΔI_{55} , średnia z pięciu strzałów) jest pokazany zarówno przy tej samej skali jak sygnał skorygowanego dichroizmu (magenta, skala lewa) jak i powiększonej (niebieski, skala prawa) z dopasowaniem zaniku przez sumę dwóch eksponensów (czerwony, $\tau_1 = 8.25 \mu\text{s}$, $\tau_2 = 67.8 \mu\text{s}$, $A_1 = 87\%$, $A_2 = 13\%$) i jednego eksponensu (zielony). 70.4% ethanol (v/v), 8°C , $8.5 \mu\text{M}$ poly[d(A-T)], $75 \mu\text{M}$ NaCl, $75 \mu\text{M}$ kakodylan pH 7, $15 \mu\text{M}$ EDTA; impuls pola E 3.45×10^6 V/m.

Pokazaliśmy, że

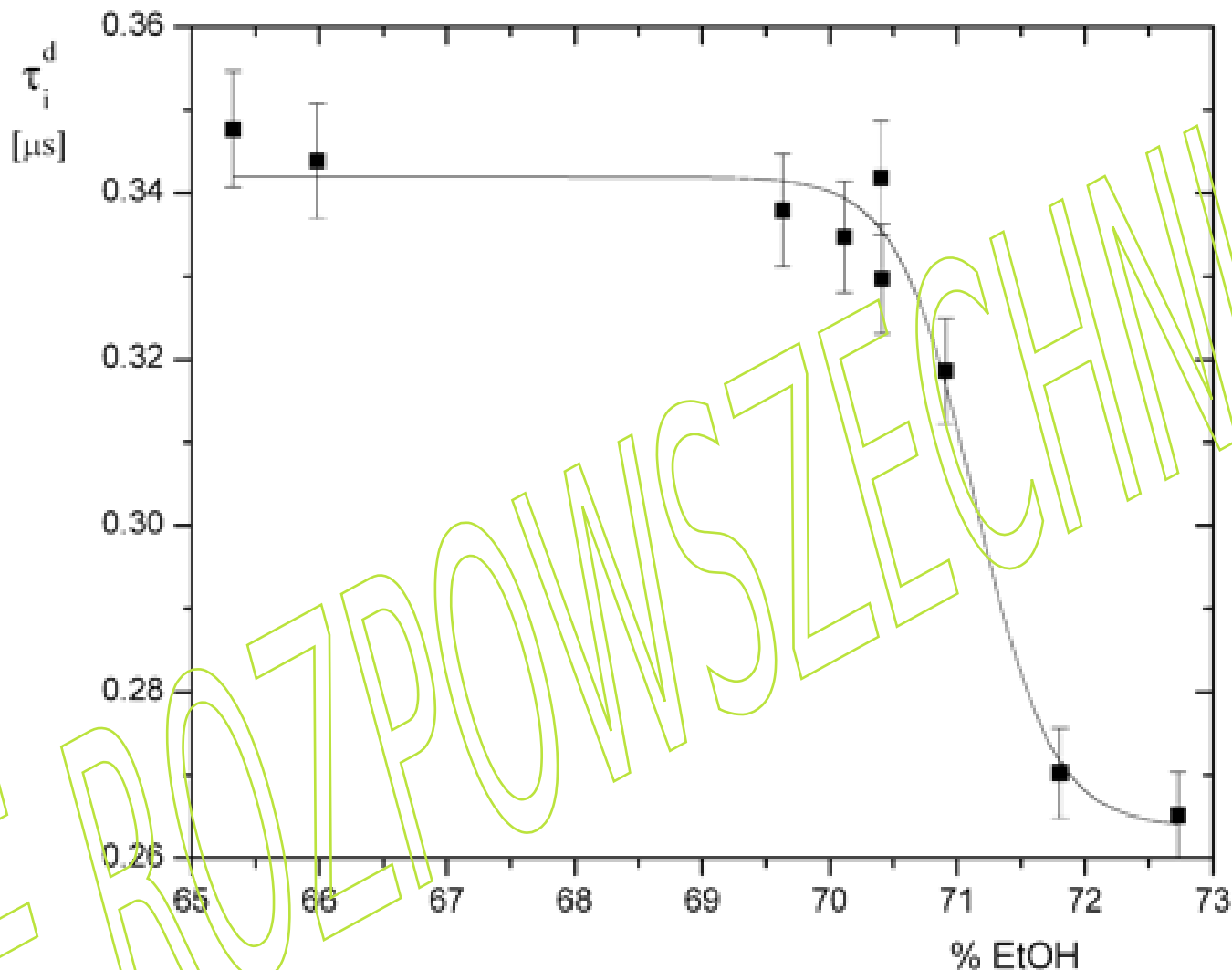
$$\tau \sim \frac{1}{D_r}$$

i

$$D_r \sim \frac{1}{L^3}$$

zatem

$$\tau \sim L^3$$



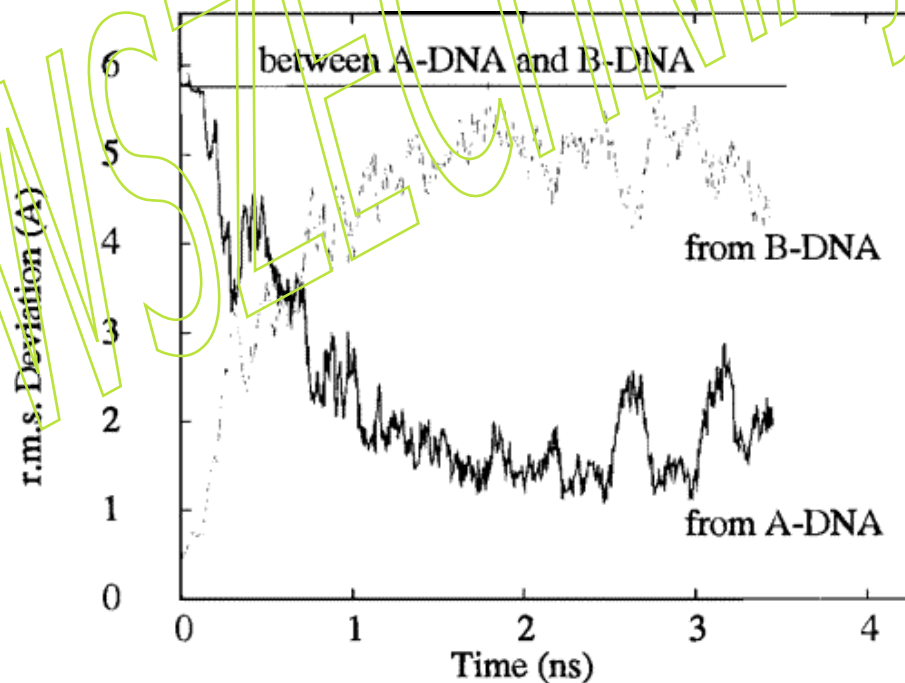
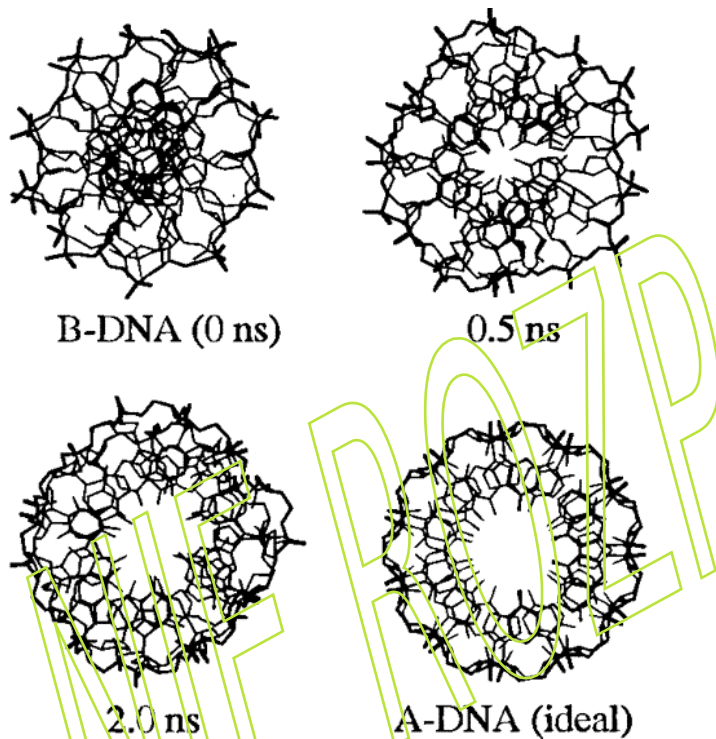
Wypadkowe stałe czasowe zaniku skorygowanego dichroizmu, τ_i , dla liczącego 70 par zasad poly[d(A-T)] jako funkcje stężenia etanolu (v/v), **poprawione na stan wody (lepkość)** w 20°C (75 μ M NaCl, 75 μ M kakodylan pH 7, 15 μ M EDTA; impuls pola $E 3.45 \times 10^6$ V/m). τ_i był obliczony na podstawie parametrów z fitów dwueksponencjalnych, zgodnie z równaniem: $\tau_i = \tau_1 \cdot A_1 / (A_1 + A_2) + \tau_2 \cdot A_2 / (A_1 + A_2)$, gdzie τ_1 , τ_2 są czasami relaksacji a A_1 , A_2 amplitudami otrzymanymi z fitowania zaniku skorygowanego dichroizmu przejściowego (Rysunek na poprzednim slajdzie). Linia ciągła reprezentuje fit funkcji sigmoidalnej.

B to A Transition of DNA on the Nanosecond Time Scale

Liqiu Yang and B. Montgomery Pettitt

Scopus 2024-11-10: cytowana w 91 publikacjach (włączając Kovaleva i współp., ACS Omega 2020)

Przeprowadzono 3,5-ns symulację komputerową roztworu DNA na poziomie atomowym. Stwierdzono, że dodekamer DNA, który zawiera miejsce rozpoznawane przez endonukleazę Eco RI, ulega transformacji z formy B do formy A w roztworze wodnym zawierającym 0,45 M soli (758 atomów DNA, 38 jonów Na⁺, 16 jonów Cl⁻, 1801 cząsteczek wody, w periodycznym pudełku 33 Å × 33 Å × 54 Å).



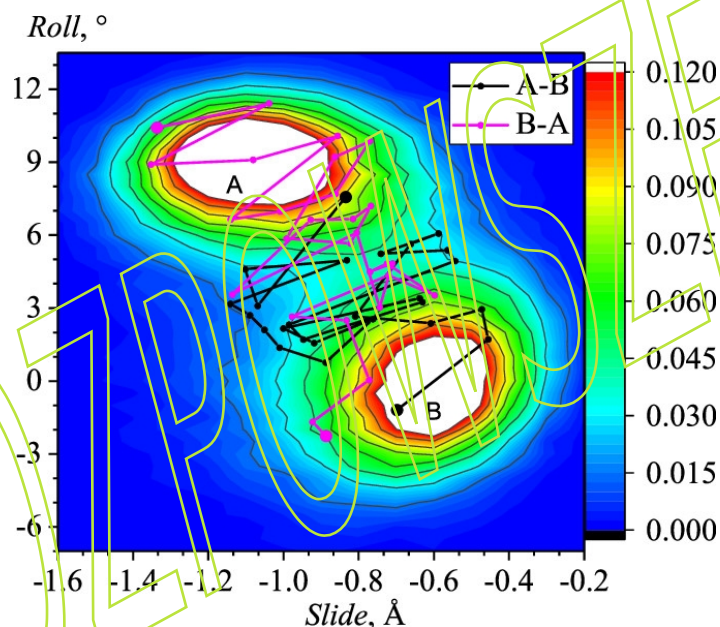
Szkicowe obrazy DNA oglądane wzdłuż osi helisy przy 0, 0,5 i 2,0 ns podczas symulacji, wraz z idealnym A-DNA zbudowanym przy użyciu QUANTA (program do analizy grafiki molekularnej opracowany przez Molecular Simulations Inc.). 486 ciężkich atomów DNA pokazano jako wierzchołki i połączono je liniami reprezentującymi wiązanie kowalencyjne. Symulacja startuje ze pierwszej struktury B-DNA rozwiązanej krystalograficznie (0 ns).

Średnia kwadratowa (r.m.s.) odchylenie położenia na atom z 410 niekończących ciężkich atomów DNA w funkcji czasu, najlepiej pasują odpowiednio do A-DNA (gruba krzywa) i B-DNA (cienka krzywa) na rysunku po lewej stronie. Rysunek pokazuje, że po przejściu B→A DNA, struktura DNA przynajmniej przez 2 ns pod koniec symulacji pozostaje bardziej podobna do A.

Kinetics of the Conformational Transformation between B- and A-Forms in the Drew–Dickerson Dodecamer

Natalya A. Kovaleva, Ivan A. Strelnikov, and Elena A. Zubova

Wykonano symulacje MD, kinetyki przejścia B-A DNA dodekameru Drew'a–Dickerson'a (12 base pairs, 24 grupy fosforanowe, 24 jony Na^+ jako counterjony, dodatkowe 32 jony soli, 16 Na^+ i 16 Cl^-). Dodekamer ten ma preferencje do bycia w formie B.



Nieuniknione wydaje się omówienie czasu przejścia od formy B do formy A uzyskanej eksperymentalnie przez Jose i Porschke. W ramach naszego modelu CG w obszarze przejścia czas transformacji wynosi 5 ± 2 ns i jest taki sam zarówno dla transformacji A-do-B, jak i B-do-A. Ten przedział czasu jest zbliżony do szacunków dokonanych dla przejść w wodzie w ramach zarówno CHARMM [Pastor, N. The B- to A-DNA transition and the reorganization of solvent at the DNA surface. *Biophys. J.* 2005, 88, 3262-3275; Yang, L., Pettitt, B. M., B to A Transition of DNA on the Nanosecond Time Scale. *J. Phys. Chem.* 1996, 100, 2564–2566] (B do A) jak i AMBER [Mazur, A. K. Titration in Silico of Reversible $B \leftrightarrow A$ Transitions in DNA. *J. Am. Chem. Soc.* 2003, 125, 7849-7859], z użyciem pełnoatomowych pól siłowych. Uważamy, że dla krótkich oligomerów DNA wynik ten odpowiada rzeczywistości, uwzględniając ten sam czas dla obu transformacji, gdyż czas ten zależy głównie od właściwości (mechanicznych) samej cząsteczki oraz w mniejszym stopniu od właściwości rozpuszczalnika.

Komentarz JMA: To jednak kłóci się z czasami relaksacji $\tau_1=8.25 \mu\text{s}$ i $\tau_2=67.8 \mu\text{s}$, dla 70 par zasad poly[d(A-T)].