SAINT PETERSBURG STATE UNIVERSITY

As a manuscript

Alexei I. Kononov

ELECTRON-EXCITED STATES OF DNA AND DNA COMPLEXES WITH SILVER NANOCLUSTERS

Speciality 01.04.07 - condensed matter physics

THESIS

for the degree of

Doctor of Physical and Mathematical Sciences

Saint Petersburg – 2020

This work is written in memory of my mother,

Kononova Maria Alekseevna

TABLE OF CONTENTS

INTRODUCTION 5
CHAPTER 1. PHOTOPHYSICS OF NUCLEIC ACIDS AND THEIR COMPLEXES WITH DYES AND METAL CLUSTERS (literature review) 15
1.1. Photoprocesses in DNA. 15
1.2. Structure and photophysical features of DNA complexes with silver clusters... 30
CHAPTER 2. EXPERIMENTAL AND THEORETICAL METHODS 42
2.1. Samples. 42
2.2. Experimental methods. 44
2.3. Theoretical methods. 51
CHAPTER 3. LOW-ENERGY ELECTRONICALLY EXCITED STATES IN DNA . 55
3.1. Calculations of the electronic excitation spectra of DNA monomers and B-form dimers of DNA bases. 55
3.2. Analysis of the conformation effect on the excitation spectra of thymine dimers. 57
3.3. Excitation spectra of adenine and cytosine dimers in noncanonical conformations. 64
3.4. Structure of the low-lying electronic states. 66
3.5. Effictivity of interaction with solar radiation for the stacked dimers in noncanonical structural forms and the hot spots for the formation of photodimers in DNA. 70
3.6. Absorption spectra of i-motif DNA. 74
3.7. Conclusions to Chapter 3. 81
CHAPTER 4. DYNAMICS OF ELECTRONICALLY EXCITED STATES IN VARIOUS DNA STRUCTURES 82
4.1. Steady-state luminescence and luminescence kinetics of various forms of cytosine DNA chains. 82
4.2. Luminescence kinetics of high molecular weight DNA. 91
4.3. Energy transfer in DNA. 93
4.4. Conclusions to Chapter 4. 98

CHAPTER 5. STRUCTURE OF DNA COMPLEXES WITH SILVER CLUSTERS. ELECTRON-EXCITED STATES OF THE COMPLEXES 99
5.1. Structures of free silver clusters and their electronic excitation spectra..... 99
5.2. Cluster structures in complexes with a 12-mer DNA and their electronic excitation spectra. 102
5.3. Complexes of silver ions and clusters with a 15-mer DNA..... 115
5.4. Conclusions to Chapter 5. 123
CHAPTER 6. DYNAMICS OF ELECTRON-EXCITED STATES IN DNA COMPLEXES WITH SILVER CLUSTERS..... 124
6.1. Formation of dark states in complexes..... 124
6.2. Energy transfer in DNA complexes with silver clusters..... 136
6.3. Fluorescence excited state dynamics of an Ag-DNA complex. 148
6.4. Conclusions to Chapter 6. 153
CONCLUSION 154
ACKNOWLEDGMENTS 155
REFERENCES 156

INTRODUCTION

Relevance and degree of scientific development of the issue. Vital activity of living systems under solar radiation exposure causes a huge interest in photonics of biological molecules. Evolution process has developed the unique molecular systems, such as retina, light harvesting antenna of photosynthetic reaction centers of plants and batteries that effectively interact with solar radiation via different pigments. Understanding the underlying quantum mechanical processes of the interaction of biomolecules with sunlight pursues not only academic interest but also has lots of applications in modern medicine and in rapidly developing branch of bioinspired materials science. Recent researches have shown that quantum coherent effects play the main role in successful functioning of natural systems [1]. A striking example of quantum-mechanical effects in living systems is the coherent transfer of electronic excitation in the process of photosynthesis. In the process of evolution, nature has created an extremely efficient light-collecting system demonstrating the unique quantum coherent properties that provide directed transport of excitation energy to the reaction center of photosynthetic systems [2]. However, primal photosystems could have appeared at the early evolution stages. Under intensive UV exposure, nucleic acids could have been used as light-harvesting molecular antennas for photochemical processes in prebiotic era [3, 4].

Nucleobases in double DNA helix (Fig. 1) are ordered in the same way as pigments in photosynthetic systems. Similar to antennas in photosynthetic systems, absorption of a photon by nucleic acids has an exciton nature that can be easily seen at circular dichroism spectra (CD) [5]. Exciton in structure of arranged chromophores means delocalization of the electron excitation. Kasha et al. have described basics of the molecular excitons in dyes aggregates [6] and applied Frenkel molecular exciton theory developed by Davydov [7] to crystals. DNA helix as an example of natural system with π–π stacking interaction is considered as a structure capable of effective charge transfer [8-10] and excitation energy [11-13]. Investigations of exciton and charge transfer in nucleic acids are very important primarily for understanding of mechanisms and routes

of photochemical reactions leading to mutagenesis and carcinogenesis. UV radiation causes different lesions in DNA and RNA such as photodimerization, photomodification, linkages and photo-oxidation [14, 15].

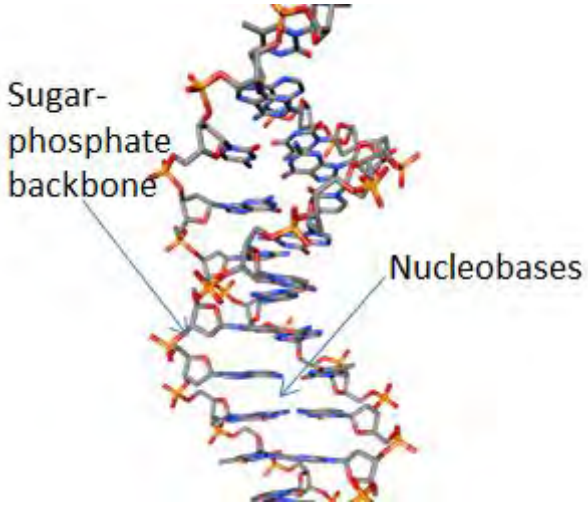


Fig. 1. Schematic diagram of the DNA double helix.

Cyclobutane pyrimidine dimers (CPD) are the most dangerous damages causing skin cancer [16, 17]. UV damages [18] and ionizing radiation damages [19] are distributed in DNA irregularly, and energy migration is treated as possible reason for such selective exposure impact. Similar to natural photosynthetic systems, exciton states in nucleic acids can enhance electron excitation energy transport through the nucleotide chain. Since acceptor sites possess low-lying electronically excited states (EES) (in order to allow the energy transition from other parts of DNA), excitation energy localizes here giving rise to further chemical reactions. But also excitation of acceptor sites can be made by direct photon absorption. Due to exponential increase in terrestrial solar radiation intensity and dramatic decrease in absorption of canonical DNA forms with a decrease in photon energy (Fig. 2), the number of photons absorbed by low-lying EES can be much higher than by other parts of DNA. This hypothesis can be proved by action spectra of CPD formation that differ from DNA absorption spectra possessing a significant intensity in the region of 300 nm where DNA absorption falls dramatically. This fact points on the presence of the structures with high quantum yield of dimerization and significant absorption cross section in the range of about 300 nm

contained in DNA, since efficiency of CPD formation is determined by the product of the quantum yield and the absorbance. The difference between the action spectrum of CPD formation and the DNA absorption spectrum is shown in Fig. 2. This difference implies that most dimerizable structures (hot spots) have low-lying EES in the range of 290−300 nm, shifted by ca. 0.4-0.5 eV to the red side from the DNA absorption maximum by 260 nm. Therefore, sites with low energy EES can probably be much more sensitive to terrestrial solar radiation due to effective direct photon absorption and excited state energy transfer from other parts of DNA. Understanding the nature and dynamics of low energy EES is a milestone in further identification of the hot spots of photochemical reactions in nucleic acids. Investigations on identification of the energy transfer radius in nucleic acids and search for ligands that act as acceptors of excited energy and are effective protectors from harmful solar impact are also of great interest. Even though there are plenty of experimental data, questions addressed to the nature of the low energy EES, range of the excited state delocalization and efficiency of the energy migration in DNA are still under intense discussion.

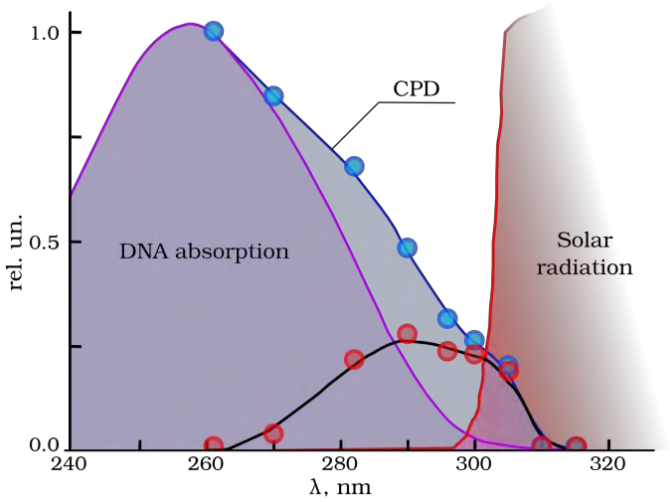


Fig. 2. Genomic DNA absorption spectrum (purple) [20], UV spectrum of terrestrial solar radiation (red) [21], action spectra of CPD formation (blue) [22] and the difference between the action spectrum of CPD formation and the DNA absorption spectrum (black).

The excitation spectra of stacked dimers of nucleobases in canonical structural forms, calculated using modern quantum-chemical ab initio methods of a high level, do not show the presence of EES noticeably shifted to the long-wavelength side, except for a small ~ 0.1 eV exciton splitting of monomeric states [23-28]. In the cells of living organisms, DNAs are actually found mainly in canonical structural forms. However, various noncanonical structures are also observed in DNA, which are determined by both the monomeric sequence and the local environment and interactions with other biomolecules and ligands [29]. Curved DNA strands may contain regions with a wide variation in the structural parameters of stacking. The unusual stacking geometry of such sites can lead to greater π – electron overlap and, as a result, a significant change in the excitation spectra, an increase in exciton splitting, and the appearance of low-energy EESs.

In the modern conditions, intensive technological processes that deplete the ozone layer lead to an increase in the intensity of UV light near the Earth's surface. Mutagenic and carcinogenic effects of solar radiation on a human body contribute to a significant increase in the risk of oncogenic diseases. Challenges for modern medicine in developing effective protection against the harmful effects of UV light at the molecular level determine the fundamental and practical interest in nucleic acids photonics and **relevance** of the project.

On the other hand, its **relevance** caused by needs of rapidly developing areas of bioinspired nanomaterials, in particular nanostructures based on DNA molecules. From a technological point of view, the properties of EES and the processes of excitation and charge migration in nucleic acids are of great interest for the development of artificial nanostructures on the nucleic acids templates. Polymer molecules are unique material for creation a variety of nano- and microstructures. This uniqueness is based on their ability to self-organization in solution and at interphase boundaries, resulting in ordering of segments of macromolecules [30, 31]. The specificity of Watson-Crick DNA pairs formed by hydrogen bonds, as well as the interaction with metal ions, allows to program the spatial configuration of structures created on the DNA template [32-34].

The optical properties of DNA-based nanostructures are of high interest for creation of materials for optical components, optoelectronics, photonics, laser active mediums, photovoltaic, optical logic devices, biosensors, medical and biodiagnostics, phototherapy. Organic dyes, metal nanoparticles, and metal nanoclusters interacting with electromagnetic radiation in a wide range from UV to IR, capable of luminescence, photosensitization, and energy transfer are widely considered as functional molecules stabilized by a DNA matrix [35-44]. In recent years, luminescent metal nanoclusters stabilized by polymers, in particular DNA, have attracted increasing interest due to their wide potential for use as biosensors, chemical sensors, and luminescent markers for bioimaging [43, 44]. Meanwhile, issues related to the structure of clusters and the nature of their EES remain largely unresolved.

The present work is aimed to establish the nature of low-lying EESs in DNA and DNA complexes with silver clusters, as well as the main processes occurring in them.

To achieve the goals in the work **the following main tasks** were solved:

1. Study of the conformational dependence of the electronic excitation spectra and the nature of EESs in DNA calculated by high level ab initio methods; identification of structures with low-lying EESs in the UV region of the solar radiation spectrum.

2. Study of the conformational dependence of electronic excitation dynamics in cytosine DNA chains.

3. Determination of the structure and photophysical features of DNA complexes with fluorescent silver clusters.

4. Determination of the radius and mechanisms of electronic excitation energy transfer in complexes of DNA with dyes and silver nanoclusters.

5. Study of the main photoprocesses in complexes of clusters with DNA (the nature of the Stokes shift of clusters and the formation of dark states of clusters).

Scientific novelty:

1. The decisive role of the exciton interaction in the interaction of solar radiation with DNA is shown.

2. A structural model of hot spots of photochemical DNA damage is proposed.

3. The dynamics of electronic excitation in the structures of the i-motif and single-stranded form of cytosine tracts was studied on a femtosecond time scale.

4. The presence of a long-lived delocalized (exciton) state in the i-motif is suggested.

5. An effective excitation energy transfer in complexes of oligonucleotides, as well as natural DNA with silver nanoclusters, was observed.

6. The exciton mechanism in the process of efficient energy migration in DNA complexes with clusters is experimentally substantiated.

7. A structural model of fluorescent silver clusters stabilized by DNA is proposed.

8. A technique for applying fluorescence saturation spectroscopy to determine the photophysical constants of luminescent silver clusters in heterogeneous solutions was developed.

9. The dynamics of electronic excitation of Ag clusters on a femtosecond time scale was studied.

Theoretical relevance. The data obtained in this work can be used for further development of theoretical models of electron excitation energy transfer in ordered structures of chromophores, as well as physical models of metal clusters and their complexes with ligands.

Practical relevance. The proposed structural model of hot spots of photochemical DNA damage and the formation of CPD in DNA serves as a necessary basis for identifying sites in DNA that are potentially vulnerable to solar radiation, and further developing possible photoprotectors that reduce the risk of oncogenic diseases. Silver nanoclusters, which are effective acceptors of excitation energy in complexes with DNA, can be considered as potential desensitizers of the negative effects of UV radiation. The data on the structure and photophysical processes in the complexes of silver clusters with DNA obtained in this work can also be used in the development of fluorescence probes for bioimaging, chemical and biosensors, UV light converters, and photovoltaic cells based on them. The developed method of fluorescence saturation

spectroscopy can be used to determine the absorption cross sections and other photophysical constants of luminescent molecules in complex heterogeneous solutions.

Methodology and research methods. Since the systems under study are highly heterogeneous, the main method used to study EESs of DNA and their complexes with silver nanoclusters and dyes was the method of fluorescence spectroscopy, which includes both stationary and time spectroscopy, providing the necessary selectivity due to the difference in quantum yields or component lifetimes. The study of energy migration in complexes of silver clusters with DNA required knowledge of the structure of complexes and their photophysical constants. The structure of the DNA matrix was determined using spectral methods, including mass spectrometry. The detailed structure of the complex was determined by modeling the excitation and polarization spectra of the fluorescence of the complexes by the methods of quantum chemistry and molecular dynamics. The photophysical parameters of the clusters were determined by the integrated use of saturation fluorescence spectroscopy and time spectroscopy. High-performance liquid chromatography methods were used to obtain homogeneous cluster solutions. A study of the stacking conformation effect on EESs was carried out by the methods of quantum chemistry and molecular dynamics using structural parameters available in DNA databases.

The main conclusions:

I. The presence of DNA base stacking structures with low-lying EESs is confirmed by the calculated excitation spectra of the stacked dimers. The stacked nucleobases with a geometry determined by the distance between the midpoints of C5-C6 $\lesssim$3.3Å bonds and the dihedral angle C5-C6-C6-C5 $\lesssim$50 ° show low-lying excitonic states in the region of 300 nm of the DNA excitation spectrum. These structures are the most effective centers (hot spots) interacting with terrestrial solar radiation, the intensity of which increases sharply in the region of wavelengths > 300 nm.

II. In the form of i-motif DNA, the absorption spectrum is significantly shifted to the red side due to the exciton interaction of the bases. The exciton state is relatively long-lived with a lifetime of the order of several picoseconds.

III. DNA-stabilized luminescent silver clusters have an extended shape realized in the complex of a cluster with a duplex or hairpin.

IV. For DNA complexes with silver clusters, which are excitation acceptors, an efficient excitation transfer from DNA to a cluster is possible in a region that counts about 30 nucleobases in a time of $\lesssim$100 fs. The energy transfer mechanism involves the delocalization of electronic excitation (coherent exciton) over about 5 nucleobases in a single DNA strand.

V. Complexes of silver clusters with DNA can have a high quantum yield of a long-lived dark state.

VI. The Stokes shift of silver clusters is mainly determined by the rearrangement of the cluster structure in the excited state for a time <100 fs.

Approbation of the work. Materials of the dissertation were reported at the following **conferences**:

Biophysical Society 56th Annual Meeting, San-Diego, California, USA, 2012.

“Quantitative imaging and spectroscopy in neuroscience” (QISIN), St. Petersburg, Russia, 2012.

3-d International School on Surface Science, Khosta (Sochi) Russia, 2013.

16th International congress on photobiology, Córdoba, Argentina, 2014. XII International Conference on Nanostructured Materials (NANO 2014), Moscow, Russia, 2014.

ESP 2015 Congress, Aveiro, Portugal, 2015.

Berlin-St. Petersburg Workshop on Structure and Dynamics of Nanoscopic Matter, Freie Universität Berlin, Germany, 2015.

International School and Conference "Saint Petersburg OPEN 2016", St. Petersburg, Russia, 2016.

ASP Conference 2016, Tampa, USA, 2016.

Fundamental chemical research of the XXI century, Scientific conference of grant holders of the Russian Science Foundation, Moscow, Russia, 2016.

8th International IUPAC Symposium «Macro- and Supramolecular Architectures and Materials» (MAM-17), Sochi, Russia, 2017.

ESP 2019 Congress, Barselona, Spain, 2019.

18th IUPAC International Symposium Macromolecular-Metal Complexes, Moscow, Russia, 2019.

4th STEPS Symposium on Photon Science, Tokyo, Japan, 2019.

VI Russian Biophysics Congress, Sochi, Russia, 2019.

The reliability of the results is confirmed by the use of a wide range of modern experimental and theoretical methods, the consistency of experimental and theoretical results, as well as the results obtained by other researchers in this field. The main results are presented in 14 **publications** in journals indexed by Web of Science and Scopus [45-58].

The thesis structure. The thesis consists of an introduction, 6 chapters and conclusion. Chapter 1 is a literature review on contemporary concepts of electronically excited states of DNA and DNA complexes with silver nanoclusters. Chapter 2 describes the basic experimental and theoretical methods. Chapter 3 is devoted to the study of conformational dependence of the electron absorption spectra of DNA. Stacking dimers of nitrogen bases in the B-form, as well as in various non-canonical structures, including in the i-motive form, are studied as model systems. The nature of the low-energy states is analyzed. The dynamics of electronically excited states on a femtosecond time scale of various forms of the cytosine oligonucleotide, as well as natural DNA, are studied in Chapter 4. The radius of energy migration in DNA complexes with a dye is determined. Chapter 5 presents the results of an experimental-theoretical approach to determining the structure of DNA complexes with silver ions and clusters. Chapter 6 is devoted to the results describing the dynamics of photoprocesses in DNA complexes with clusters. In particular, the formation of dark

states, energy transfer, and the dynamic Stokes shift in complexes are investigated.

The total volume of the thesis is 181 pages with 111 figures and 13 tables. The bibliography contains 271 titles.

CHAPTER 1. PHOTOPHYSICS OF NUCLEIC ACIDS AND THEIR COMPLEXES WITH DYES AND METAL CLUSTERS (literature review)

1.1. Photoprocesses in DNA.

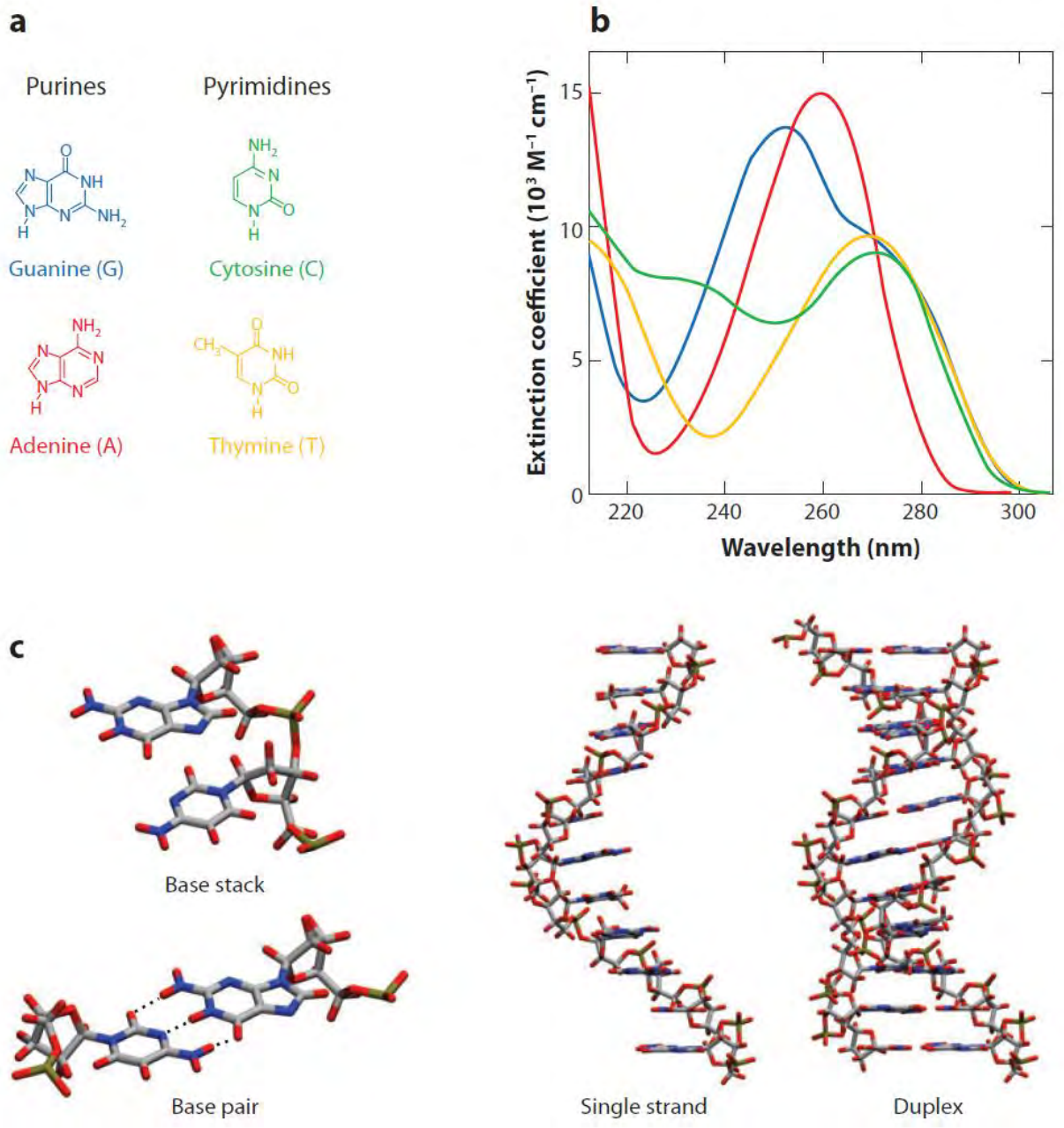


Fig. 1.1.1. Chemical structures (*a*), UV absorption spectra of the DNA bases (*b*), and basic assemblies of nucleobases (*c*) [13].

The nucleic acids absorption of UV light in the UV range of solar radiation is determined by the spectral properties and stacking interactions of nucleic bases (Fig. 1.1.1). Such stacking interaction leads to the collective (exciton) nature of the UV photons absorption. EES of the system of interacting chromophores can be represented as superposition of monomer states [59]:

$$|k\rangle = \sum_{n=1}^{N} \varphi_{kn}|n\rangle \text{ for } k = 1, \dots, N,$$

Where φ_{kn} is a constant representing the contribution of monomer n to the eigenstate k. In the simplest case of a dimer of heterogeneous molecules, the wavefunction can be obtained analytically as:

$$|k\rangle = cos\,\theta\,|1\rangle + sin\,\theta\,|2\rangle, \quad |k'\rangle = cos\,\theta\,|2\rangle - sin\,\theta\,|1\rangle,$$

where $tan\,2\,\theta = 2\,|J_{12}|\,/(\varepsilon_1 - \varepsilon_2), \quad 0 \le \theta < \pi/2.$ The energy gap (exciton splitting) between two exciton states is

$$E_k - E_{k'} = \sqrt{(\varepsilon_1 - \varepsilon_2) + 4|J_{12}|^2},$$

where ε_i - is the EES energy of the ith monomer. J - is the Coulombic interaction Hamiltonian between the monomers, which is responsible for the energy transfer between the monomers. Fig. 1.1.2 schematically shows the exciton splitting of the dimer formed by two nucleic bases (thymines), and the calculated orbitals of the corresponding states are also shown.

Due to the collective character of an excitation in molecular ensembles, the usual Förster theory of resonance energy transfer does not work in the case of exciton interactions between chromophores. For the strong-coupling exciton case, the energy transfer rate is determined by the reciprocal of the resonance lifetime of the exciton state [6]:

$$t = h/(E_k - E_{k'}),$$

where h is the Planck's constant. Calculations of the complicated dynamics of the system of interacting chromophores should consider energetic and conformational disorder and all relevant vibronic states, including system-bath interactions. Various theoretical approaches to the dynamics of the excitation can be found in the literature [2, 59, 61-64]. For example, Fig. 1.1.3 shows the dependence of the energy transfer rate relaxation of the exciton for dimer on the difference between the energies of the excited states of the monomers, calculated using different models [59].

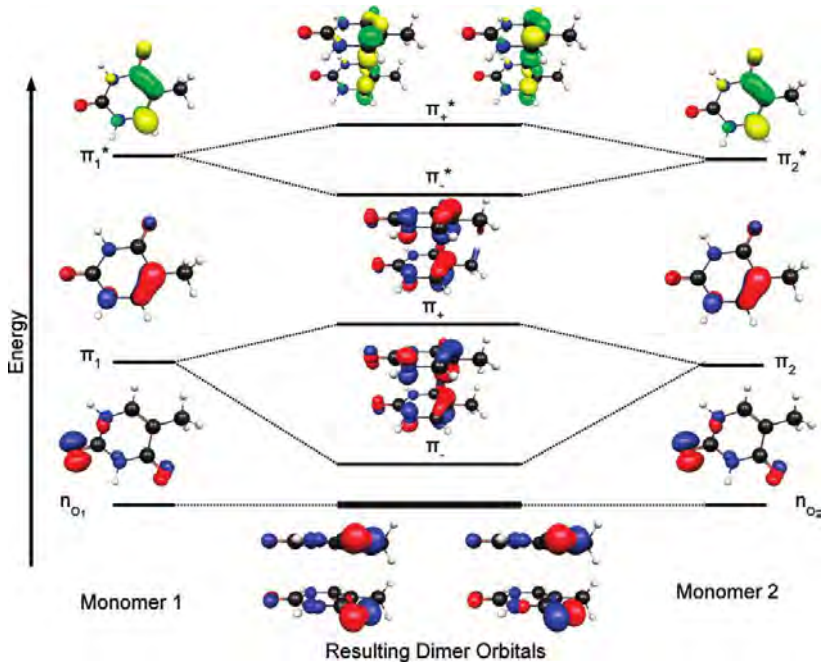


Fig. 1.1.2. Excited states for thymine monomer n_o, π, π^* and the resulting states of thymine dimer [60].

The exciton interaction (splitting) in the electronic absorption spectra of DNA is almost negligible (in the case of weak exciton interaction) [11]. In some cases, the maximum of the fluorescence excitation spectra of adenine and cytosine polymer components was slightly shifted to the red region in comparison with the spectra of the monomer with the presence of long-wavelength tail, which was interpreted as a presence of the exciton splitting [65]. Exciton splitting is clearly seen in the circular dichroism (CD) spectra of nucleic acids (Fig. 1.1.4) [5]. The conservative CD spectrum

(two bands with opposite sign) is a characteristic feature of the exciton interaction of the chromophores.

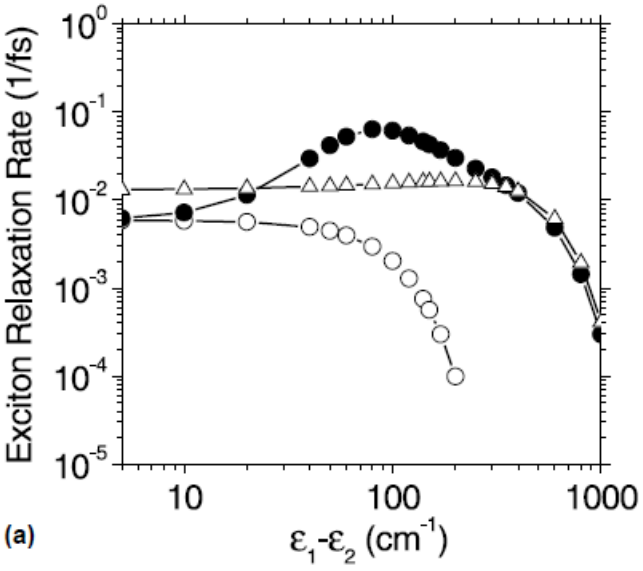


Fig. 1.1.3. Exciton relaxation rates as a function of energy gap of two monomers predicted by the Forster model (open triangles), the traditional Redfield model (open circles), and the modified Redfield model (solid circles), J=100 cm^{-1} [59].

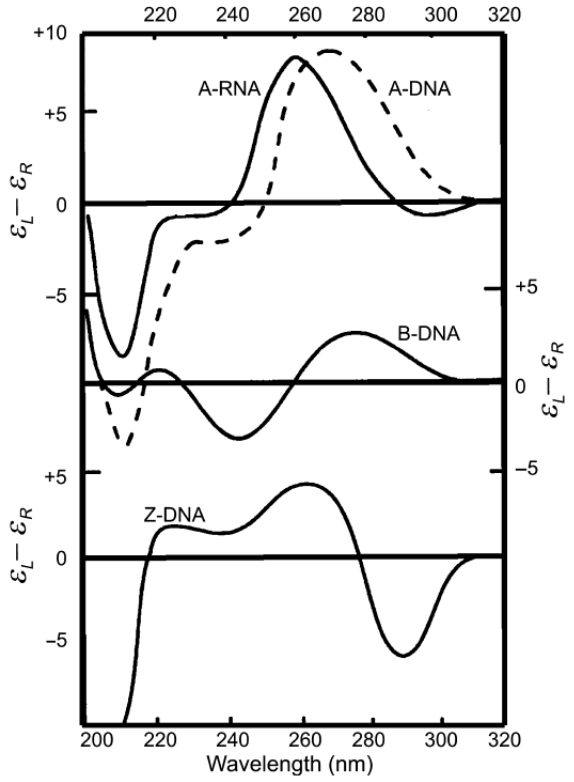


Fig. 1.1.4. Circular dichroism spectrum for different DNA forms [5].

Frenkel exciton states are formed by the coupling of states of nucleobases. Many theoretical works using various levels of theory, from semi-empirical to high-level ab-initio methods, gave evidence for excitonic interactions, which is reviewed, for example, in [66]. For example, semi-empirical methods predicted that excitonic eigenstates calculated for ideal helix geometry are delocalized along the entire length of a double helix consisting of 20 base pairs [67]. The spatial extent is reduced to sizes from four to eight base pairs due to the inclusion of conformational (off-diagonal) disorder by means of structures obtained by molecular dynamics (MD) simulations [68]. At last, delocalization is further reduced by the inclusion of homogeneous broadening (diagonal disorder) to a model [69, 70]. According to calculations, almost half of the excitons are localized on a single base, the rest at least are delocalized on two bases.

It should be noted that these theoretical approaches deal with the Franck-Condon excited states. However, the question is how long does the exciton state in DNA last. In this respect, so far there is no conclusive experimental evidence that the delocalized states persist even on a femtosecond time scale, which is not surprising taking into account small values of exciton splitting (~0.1 eV) [71] in comparison to the DNA absorption band width (~0.5 eV). Homopolynucleotides are widely used models in studying the excited-state dynamics in the stacked nucleobases. However, even for the most well-studied polyadenilyc DNA strands, the conclusions drawn regarding the primary photoprocesses have often been controversial. For example, Kohler et al. believed that long-lived charge-transfer states (excimers) are formed directly from the Franck-Condon state of the stacked bases [72, 73]. Phillips et al. discussed the dynamics of the excited states already localized on a single individual base [74]. As was noted in [13, 73], exciton localization in DNA most likely occurs faster than experimental time resolution (<100 fs). Based on quantum chemical calculations, Improta and Barone showed that the excited state dynamics in stacked adenines is complex, including localization of the excitation on a single base, “neutral” and “charge-transfer” excimers formation, involving a decrease of the stacking distance [75]. This complex picture agrees with a complex multiexponential decay of the excited states observed in polyadenines [74, 76]. Based on UV/IR pump–probe experiments, Fiebig et al.

suggested that an exciton state delocalized over three-to-four bases in polyadenines is presented on a picosecond time scale [77]. However, Kohler et al. have refuted that result and explained it as being due to base-stacking disorder [73].

Fluorescence from DNA oligomers and polymers was first studied by Gustavsson, Markovitsi, and their colleagues by means of the time-resolved femtosecond upconversion technique [76, 78-84]. Time constants, which showed that fluorescence decays at no more than a few picoseconds, were obtained in these experiments. Experiments on time-resolved fluorescence anisotropy were interpreted as a confirmation for fast internal conversion or intrabrand scattering among the excitonic states that differ from each other in polarization properties. For instance, the fluorescence anisotropy of poly(dA)·poly(dT) decays by about 30% in 1 ps after excitation (Fig. 1.1.5).

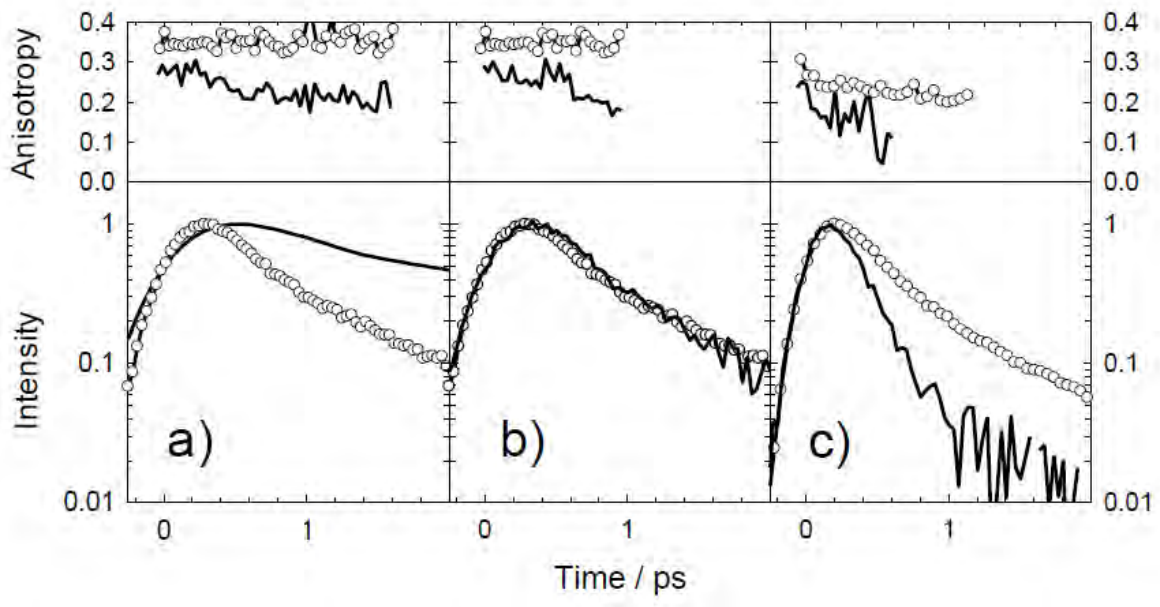


Fig. 1.1.5. Fluorescence anisotropies (upper) and fluorescence decays (lower) obtained at 330 nm for a) poly(dA)•poly(dT), b) poly(dAdT)•poly(dAdT) and c) poly(dCdG)•poly(dCdG) in phosphate buffer. The corresponding traces for an equimolar mixture of monomers are also shown (circles) [83].

Markovitsi et al. believed that the lower initial fluorescence anisotropy value and its faster decay in the polymer compared to monomers suggest that a part of the DNA

fluorescence stems from the exciton states. On the other hand, these features of the anisotropy can be explained by the complex dynamics involving both rapid (faster than time resolution) localization of the excitation and subsequent excimers formation.

Based on steady-state UV absorption and CD spectra of single-stranded homo-polynucleotides, it is believed that the length of exciton in NAs is limited to a pair of the bases [65, 85]. However, it may be longer in rigid and Ag-stabilized DNA duplexes. Experimentally, it might manifest itself in the transient absorption spectra in a time domain shorter than the time of exciton localization. Enhancement of the ground state bleaching due to exciton delocalization was observed in photosynthetic light-harvesting systems [86, 87] and in the dye complexes with DNA [88]. Meantime, no enhancement is seen in the transient absorption spectra reported in the literature for polymeric NA components compared to monomers, and at least at the time of ~ 100 fs (instrument time-resolution) after the pulse, the ground state absorption bleaching is the same as that of the monomers [72, 73].

The dynamics of emissive states in DNA can only partially be described by femtosecond fluorescence upconversion. Usually, emission at times greater than 10 ps after photoexcitation is too weak for recording by femtosecond spectroscopy. Experiments using timecorrelated single-photon counting (TCSPC) have shown that a small fraction of the bases emit on the nanosecond time scale [84]. These long-lived excited states have the CT character, which drastically reduces the radiative decay rate. The experiments performed using the pump-probe technique show that overpopulation of the groundstate occurs much more slowly in photoexcited DNAs than it is predicted by the rapid decrease in fluorescence observed in the femtosecond upconversion spectroscopy [72, 89]. This disagreement is due to the fact that these methods are sensitive to various excited states. The Frenkel exciton states quickly decay to excimer/exciplex states, which have much lower radiative transition rates. These relatively dark states are responsible for emission at pico- and nanosecond times. The experiments on dinucleotides [89] finally confirm the hypothesis that excitons in DNA quickly decay to exciplexes, which then relax on a picosecond time scale due to charge recombination. The decay rates of the long-lived states reduce with the energy growth

of the charge-separated state formed due to the transfer of an electron from one of stacked base to another (Fig. 1.1.6). Identical long-time decays are observed both for the adenine dimer and for the homopolymer containing hundreds of bases. This proves that, despite the polymer length, the emerged exciton passes to a state localized on two bases.

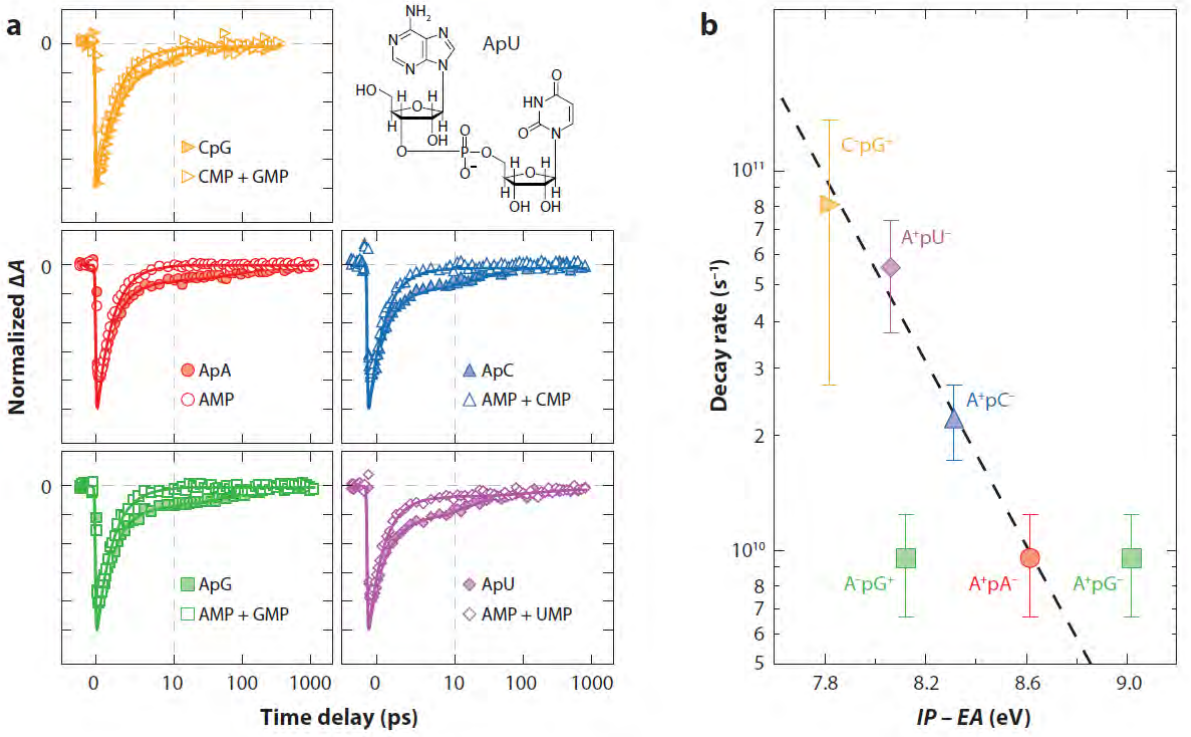


Fig. 1.1.6. (*a*) Ground-state bleaching signals for dinucleosides and equimolar mixtures of their respective monomers. The structure of ApU is shown. (*b*) The correlation between the decay rate of the long-lived states of the dinucleosides and the thermodynamic driving force for charge recombination ($IP - EA$) [13].

However, the rate of the exciplex states formation and the conditions of their occurrence are remaining unclear. Fig. 1.1.7 summarizes the current understanding of the various photophysical pathways of EES relaxation in DNA mentioned above.

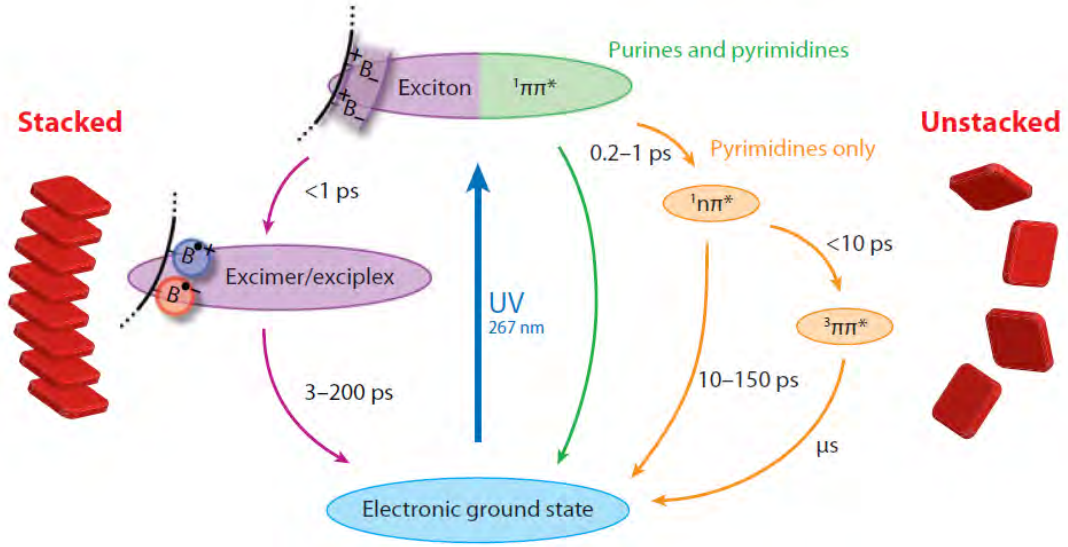


Fig. 1.1.7. Photoprocesses in DNA. Left: Stacked bases are excited to an exciton state, which decays to an exciplex state in less than 1 ps. The exciplex state returns to the ground state after 10–100 ps through charge recombination. Right: UV excitation of unstacked or poorly stacked bases creates localized states that decay to the ground state within 1 ps [13].

The main mutagenic photoproduct in DNA is the cyclobutane pyrimidine dimer (CPD) [14]. Basically, this intrastrand photoproduct is formed by (2 + 2) cycloaddition of the C5-C6 double bonds of adjacent thymines by the formation of a cyclobutane ring (Fig. 1.1.8).

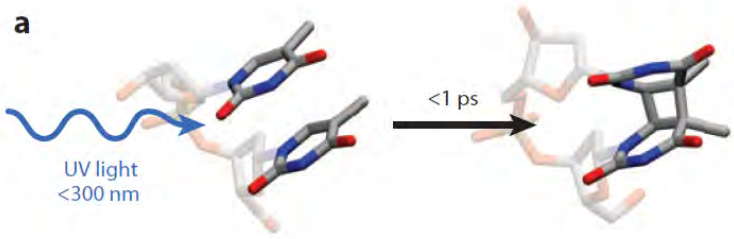


Fig. 1.1.8. Thymine dimer formation occurs in less than 1 ps for favorably orientated thymine bases [13].

Schreier et al. [90] showed by means of time-resolved IR spectroscopy that IR marker bands typical to the *cis-syn* thymine dimer are completely formed in less than 1 ps after excitation of single-stranded $(dT)_{18}$ at 266 nm. Subpicosecond dimer formation indicates that the reaction proceeds directly from the $^1\pi\pi^*$ state. It is assumed that the reaction probability depends majorly on the relative orientation of the bases at the excitation instant, since dimerization occurs faster than whole-base motions. Thus, Schreier et al. [90] suggested that the low quantum yield of dimerization observed in DNA is due to the average rotational angle of 36° between successive base pairs is not sufficient for photodimerization. Quantum chemical calculations and MD simulations showed that fraction of highly dimerizable nucleic acids dimers falls in narrow range of conformations [91-93]. CPD formation occurring at rate less than 1 ps means that EES dynamics on a femtosecond time scale is the main factor leading to further photodimerization.

Properties of the Franck-Condon excited states of DNA have been a subject of extensive quantum mechanical (QM) studies with the use of ab initio methods and time-dependent density functional theory (TD DFT) [23-28, 60, 71, 75, 76, 94]. DNA stacked dimers as a main model system in the high level ab initio calculations of vertical transitions do not exhibit markedly red-shifted transitions compared to monomer absorption, apart from a small ~ 0.1 eV exciton splitting in homodimers [23, 25, 27], resulting in a weak wavelength tail [23] relative to the monomer's spectrum. Neither increasing the amount of interacting bases in single DNA strand nor base pairing [23, 27] in the double strand practically does not affect the calculated excitation energy of the lowest-energy excitonic state. It was also shown that only delocalized excitonic ππ* states contribute to the low-energy part of the absorption spectra, while charge-transfer (CT) transitions appear to be blue-shifted relative to the absorption maximum [23-26, 28, 94]. Meantime, a significant deviation of the fluorescence excitation spectra of some dinucleotides and oligonucleotides from their absorption spectra in the region of 290-310 nm [65, 95, 96] of a long-wavelength tail in DNA absorption spectra [20, 97] suggests possible electronic transitions in that spectral range. Since the excitation spectra allow to detect the emission at a particular wavelength, the method allows one to

single out the different conformations, including rare conformations with large fluorescence quantum yields. In our works, long-wavelength bands in the region of 300-320 nm were previously observed in the fluorescence excitation spectra of adenosine monophosphate aggregates (Fig. 1.1.10) [98] and also adenyl polynucleotide (poly-A) at room temperature (Fig. 1.1.11) [96].

The authors of [97] stated that even in UVA range above 330 nm CPDs were formed through direct DNA absorption. Based on theoretical calculations with the use of TD DFT approach considering also solvent effects, it was proposed that charge transfer states contributed significantly to the long-wavelength tail of DNA absorption due to higher inhomogeneous broadening of CT states [75, 93, 99]. However, in contrast to TD-DFT, QM/MM calculations performed for DNA duplexes at high *ab initio* level show that spectral broadening is mostly caused by intramolecular vibrations, and CT states do not affect the low-energy part of the spectra [28, 94].

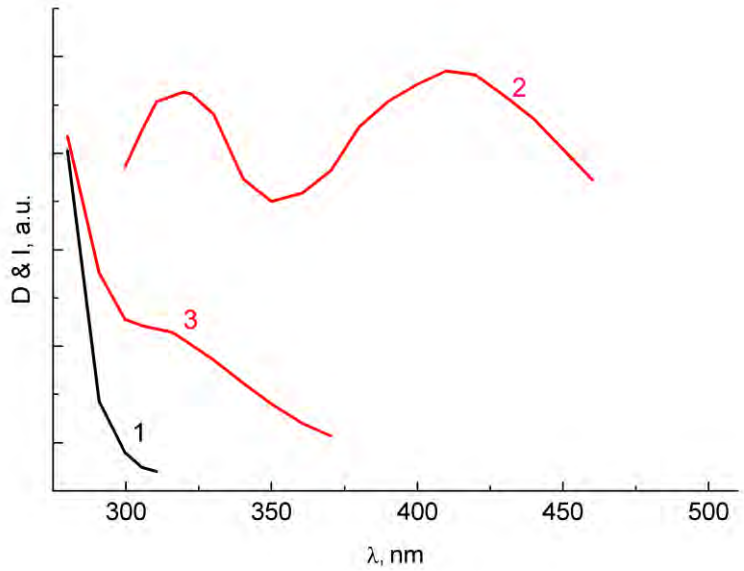


Fig. 1.1.10. Absorption (1), luminescence emission (2, λ_{ex} = 281 nm) and luminescence excitation (3, λ_{em} = 420 nm) spectra of $5 \cdot 10^{-3}$ M adenosine monophosphate at pH 8 [98].

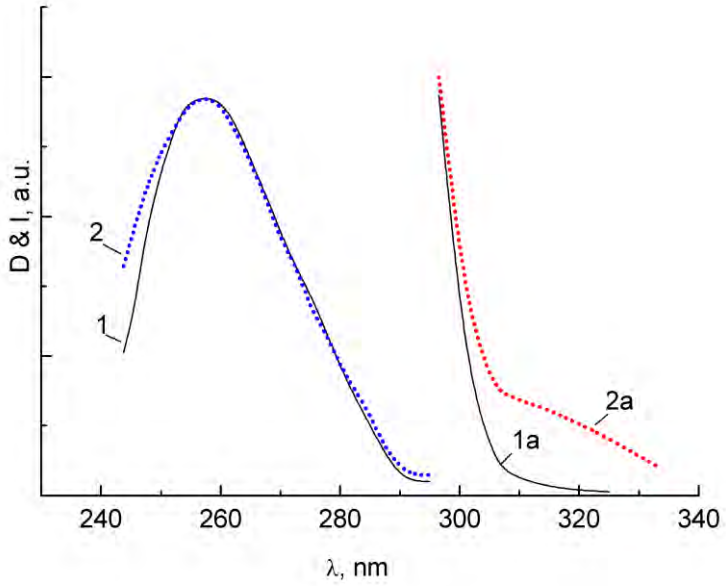


Fig. 1.1.11. Absorption (1) and fluorescence excitation (2) spectra of poly(A) at T = 290 K and pH 8; 1 and 2: $c=5\cdot10^{-5}$ M; 1a and 2a: $c=10^{-3}$ M, λ_{ex} = 400 nm [96].

All the theoretical studies, however, dealt with classical A or B stacking geometries [23, 25, 27], artificial [24, 60], optimized or molecular dynamics (MD) sampled geometries [24, 26, 28, 75, 94] with inter-base distances close to canonical stacking forms. As an exception, it is worth noticing ref. [60], where authors studied the geometry dependence of the splitting, and also ref. [24], where the distance dependence of CT states in heterodimers was examined. In living organisms, DNA mostly exist in the canonical forms indeed, but occurrence of some other conformations is also possible, depending on the sequence and local environment conditions [29]. DNA in cell is wound around nucleosomes, being in partially distorted conformation relative to B form. Moreover, DNA is in single-stranded form during replication process. An unusual stacking geometry in the bent NAs can enhance electron overlap and thus change significantly the electronic spectrum. It has been shown indeed that exciton splitting is very sensitive to inter-base distance and rotation angle (Fig. 1.1.12) [60].

Although MD simulations can explain the low quantum yields of CPD formation by the rareness of reactive conformations [91, 92], MD is not able to give reasons for experimentally observed non-random distribution of CPDs [18, 100-107] and to predict

hot spots of the photolesions in genomic DNA. The action spectra of CPD formation in many cases [22, 108, 109] differ from DNA absorption spectrum, exhibiting a significant intensity in the range of about 300 nm where the DNA absorption is very low (Fig. 1.1.13).

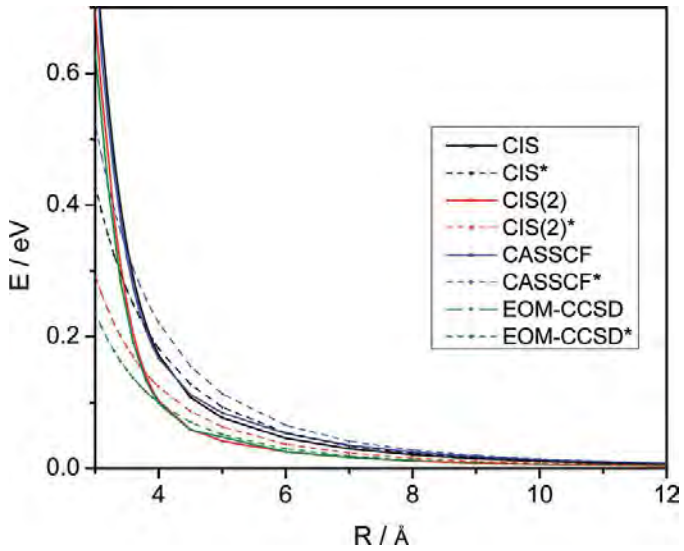


Fig. 1.1.12. Exciton splitting for thymine dimer as a function of *R* from different ab initio methods, CIS/cc-pVDZ, CIS(2)/cc-pVDZ, CCSD/6-31G(d), and CASSCF/6-31G(d). The couplings calculated using the transition dipole approximation are also shown as dashed lines [60].

This fact means that a minor, highly dimerizable fraction of pyrimidine bases in DNA has a different absorption spectrum, since the quantity of CPDs is the product of the absorbance and the quantum efficiency. The difference between the action spectrum of CPD formation for genomic DNA [22] and the absorption spectrum of thymine containing oligomer [99] (Fig. 1.1.13) suggests that a fraction of dimerizable pyrimidines has electronic transitions in the range of 290-300 nm, shifted to the red side from the absorption maximum ca. 0.5 eV. The product of the action spectrum (or absorption spectrum) and a solar flux spectrum is the effectivity spectrum for formation of the dimers by the terrestrial solar radiation, which reflects the rate of CPD formation (or absorption) at a given wavelength. The effectivity spectra for both major ground state conformation with the absorption spectrum coinciding with the solution spectrum, and the minor fraction with absorption spectrum coinciding with the action spectrum,

plotted in Fig. 1.1.13, have a maximum at about 310 nm. The integral effectivity, however, in the case of the minor fraction is much higher than that of the major fraction. The minor fraction of stacked pyrimidines with electronic transitions at 300 nm thus appears the most sensitive to solar radiation, and the hot spots of CPD formation under solar radiation can be located in those sites.

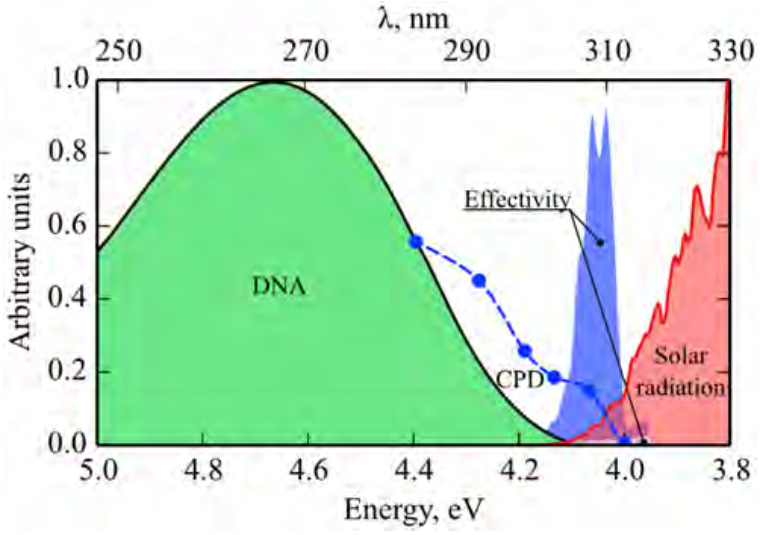


Fig. 1.1.13. DNA absorption spectrum: $(dT)_{20}$ [99], action spectrum for formation of pyrimidine dimers (plotted from data of immunodot blot assay [22]), UV spectrum of terrestrial solar radiation [21], and effectivity spectra obtained as the product of the solar spectrum and the absorption or action spectrum [49].

Earlier, in the fluorescence kinetics of dye complexes with DNA, we discovered a fast decay component of ~ 10 ps, the relative contribution of which increases with increasing dye/DNA ratio. Fluorescence quenching was also observed on a nanosecond time scale. These observations were explained by the presence of quenching sites in DNA and energy migration [88, 98]. The quenching of a fraction of bound dyes was explained by electron transfer from dyes to DNA bases, as confirmed by flash photolysis. This fact indicates the presence of stacked bases in DNA with low-lying electron orbitals and, as a result, a large reduction potential in comparison with monomers and the main form of stacking.

DNA lesions caused by UV [18, 100-107] and ionizing radiation [19] are in fact not random, and long-range energy transfer was discussed as a possible explanation of the

observed effects [12, 19]. Exciton states in DNA can enhance energy transport in a similar way to natural photosystems. Direct experimental observations of long-range delocalization of excitations in DNA have not been obtained so far, in contrast to photosynthetic light-harvesting systems, for which it was made earlier by means of nonlinear absorption and fast transient absorption pump-probe spectroscopy [86, 87, 110, 111]. Technical difficulties in the deep UV range and the heterogeneity of the studied systems hinder probing of the exciton dynamics in DNA. As an alternative approach, experiments on energy transfer using the bases as donors and molecules bound to DNA as acceptors can be used to measure the distance and efficiency of the excitation energy migration in DNA directly. Dyes as acceptors were used to study the energy migration in DNA at room temperature [12, 112-114]. Modified luminescent bases [12, 115, 116] were also used as acceptors. The studies proved the energy transfer over only a few bases. A relatively high transfer efficiency was observed in the case of a 10-mer adenine with aminopurine as an acceptor (about 50%) [12]. Obviously, long-range coherent effects did not play a major role in the relatively low-efficient energy trapping by the acceptors used in those systems. The only reliable experimentally substantiated result representing energy transfer involving a large amount (about 100) of nucleobases to a dye molecule was obtained at 77K [113]. Though, the transfer mechanism was the Förster transfer from the bases surrounding the dye in a compact polynucleotide form [114].

Gwinn and co-authors [117] showed that Ag clusters were able to act as acceptors of the electronic excitation in DNA-cluster complexes. Based on analysis of fluorescence excitation spectra of the clusters, it was shown that the excitation energy was transferred from DNA to the clusters. The conclusion was drawn on the basis that all the clusters studied in the work showed an excitation band that practically coincided with the DNA absorption (Fig. 1.1.14). Moreover, the energy migration radius was large in comparison to the previously used acceptors. The data showed that the excitation energy was transferred to the cluster from about 10 bases. However, the heterogeneity of the solutions and uncertainty regarding the contribution of the clusters to the excitation spectra hindered correct estimation of the energy transfer range. And due to lack of the

structure of the fluorescent complexes, the mechanism of the transfer was uncertain. However, silver clusters as new acceptors seem very promising for studying the processes of energy migration in DNA.

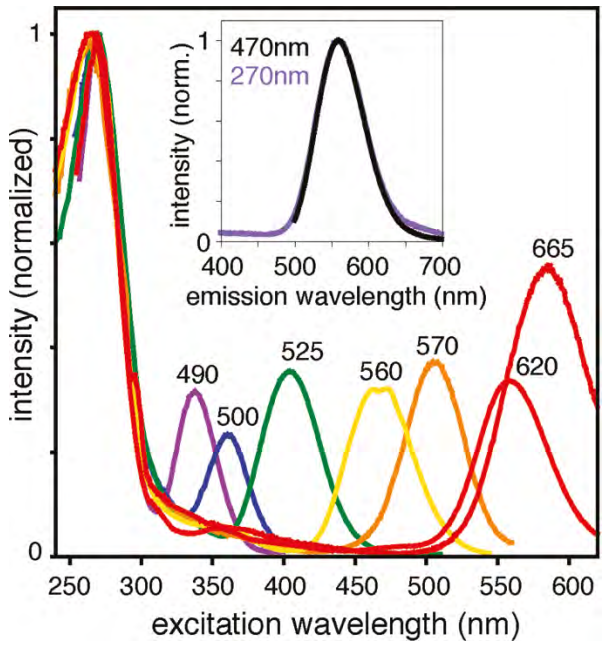


Fig.1.1.14. Fluorescence excitation spectra of Ag-DNA clusters studied in [117].

1.2. Structure and photophysical features of DNA complexes with silver clusters.

Subnanometer metal clusters have been the subject of increasing interest in the past decade [44, 118, 119]. Exhibiting bright emission from visible to near infra-red range, they are considered as a new promising type of fluorophore for various applications in electronic and photonic devices, bioassays, chemical sensors, biosensors, photovoltaic cells etc. Clusters in their energy structure occupy an intermediate position between atoms and nanoparticles (Fig. 1.2.1). Clusters consist of several atoms (from two atoms to several tens). The energy gap is larger than kT, and this allows clusters to luminesce.

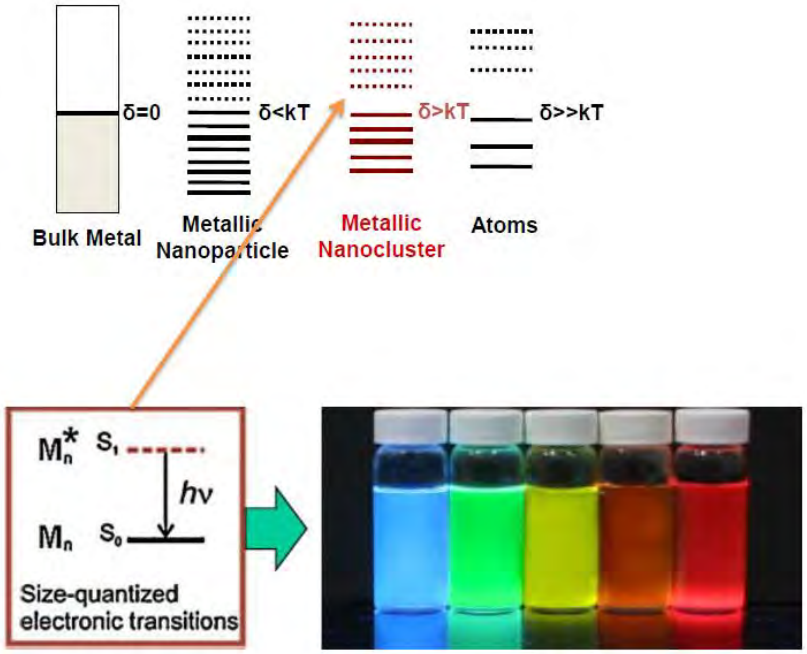


Fig. 1.2.1. The electronic energy levels of metals, metal nanoparticles, nanoclusters and atoms. Nanoclusters have an energy gap larger than thermal energy (kT), which is the reason for their luminescence in a wide spectral range.

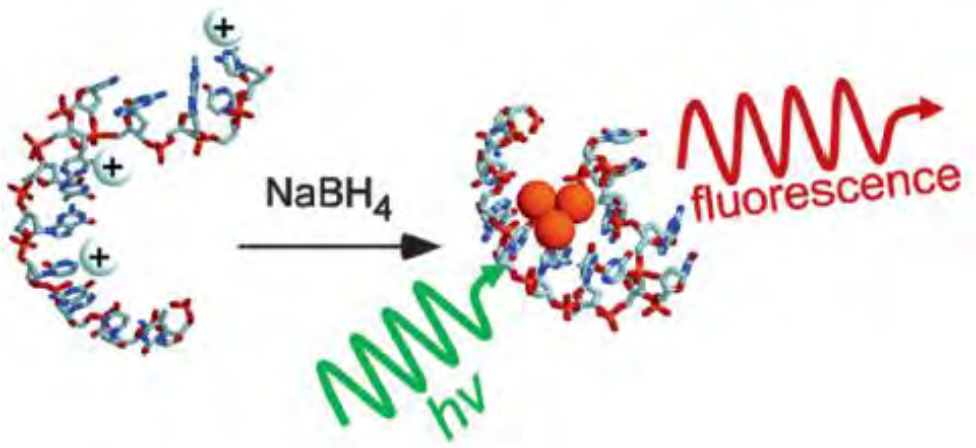


Fig. 1.2.2. Scheme for the synthesis of fluorescent silver clusters on DNA [121].

Various synthetic “bottom-up” and “top-down” strategies have been developed by now. Most methods for synthesis of the fluorescent metal clusters are carried out in solutions with the presence of stabilizing agents (typically, a polymer) that prevent aggregation of the clusters [120]. Ag-DNA clusters can be synthesized quite simply by

borohydride reduction of solutions of Ag+ mixed with DNA template strands that have sequences selected to produce fluorescent solutions. The general scheme for the synthesis of luminescent clusters on a polymer (in particular, DNA) matrix is shown in Fig. 1.2.2. First, silver nitrate ($AgNO_3$) is added to the oligonucleotide solution, and Ag ions form complexes with the bases, and then a reducing agent, usually borohydride ($NaBH_4$), is added to the solution. After some time, a cluster of reduced silver ions forms on the matrix.

The strong variation in Ag cluster properties with a little change of host strands is an exciting aspect of Ag-DNA complexes. Table 1.2.1 [122] presents data on a number of silver clusters on DNA that fluoresce in a wide spectral region from blue to IR. As can be seen from the data presented, many clusters are characterized by a relatively high quantum fluorescence yield with a lifetime of the order of several nanoseconds and extremely high absorption coefficients in the visible region. Such DNA-stabilized Ag clusters (AgN-DNA), first reported in [121], are now developed in applications that range from bioimaging [123] to molecular electronic elements [124, 125], sensors for mutations [126-128], microRNAs [129], and DNA target [130]. These applications are reviewed in [131], based on the special sensitivity of fluorescence color and intensity to the environment of the silver cluster [129, 130].

Very little is known about the structure of fluorescent clusters, demonstrating excellent brightness and photostability, although a great progress has been made in the synthesis of a large number of them. This is mainly due to heterogeneity of the synthesized clusters. Fluorescence excitation spectra of the clusters, as a rule, are very different from the corresponding absorption spectra [117, 132], indicating that chemical yield of the clusters is commonly very low in comparison to a main share of non-emitting dark clusters and nanoparticles. The study of the structure of emitting clusters is difficult due to a presence of a sufficient amount of non-luminescent metal structures in solution. Any structural data obtained for such highly heterogenic solutions are in fact not related to the luminescent clusters. To reveal the structure of the fluorescent complexes, the chromatographic or electrophoretic purification of the clusters [132, 133] seems to be promising.

Table 1.2.1. Characteristics of the DNA-based fluorescent Ag clusters [122].

DNA sequences (from 5′ to 3′)	The number of bases	λ_{ex}/ λ_{em} (nm)	The number of Ag atoms in the DNA–Ag NCs	Lifetime (τ, ns)	ε (10^5 $M^{-1}cm^{-1}$)	Quantum yield (%)
AGGTCGCCGCCC	12	580/642	1–4			
dC_{12}	12	580/665	2–7			
ssC_{12}	12	≈ 650/≈700	2–3	2.6	3.2	17
CCCATATTCCCC	12	≈590/660		3.0±0.02 τ_{OPE}		18
				3.1±0.02 τ_{TPE}		
CCCTATAACCCC	12	≈605/680		3.0±0.02 τ_{OPE}		37
				3.1±0.02 τ_{TPE}		
CCCTAACTCCCC	12	≈630/710		3.5±0.02 τ_{OPE}		31
				3.4±0.02 τ_{TPE}		
CCCTTTAACCCC	12	≈350/485	<6			
CCCTCTTAACCC	12	≈420/520	<6			16±3
CCCTTAATCCCC	12	≈470/572	<6		2.0±0.4	38±2
CCTCCTTCCTCC	12	≈530/620	<6		1.2±0.3	32±4
CCCTAACTCCCC	12	≈650/705	<6		3.5±0.7	34±5
CCCACCCACCCTCCCA	16	750/810	10	1.8	1.8±0.5	30±2
C_{12}	12	467/523		3.6±0.1	1.2±0.3	27±2
$AATTC_{12}AATT$	20	480/562		4.3±0.1	2.0±0.4	38±3
$CGAAC_{12}CGAA$	20	543/590		2.0±0.1	3.5±0.7	36±3
CGCGCCCCCCCCCCCCGCG	20	560/615		2.5±0.1	9.5±1.9	42±3
$ATATC_8ATAT$	16	570/635		2.3±0.1	2.8±0.6	26±3
$GGGGC_8GGGG$	16	600/670		2.7±0.1	3.2±0.7	43±3
$CGAACGCGC_{12}CGAACGCG$	28	560/618		3.5±0.1	2.5±0.5	16±2
ATCCGTCnACGGATA (n=3-12)	16-25					
$TATCCGTC_5ATAGGCA$	19	572.2/647.6				
$TGCCTATG_5ACGGATA$	19	509.2/573.6				
$TATCCGTC_5ACGGATA$	19	581.7/646.3				
$TATCCGTG_5ACGGATA$	19	544.6/614.6				
$TATCCGTA_5ACGGATA$	19					
$TATCCGTT_5ACGGATA$	19					
TGACTAAAAACCCTTAATCCCC	22	460/550		2.5, 0.6		0.2±0.02
AGTCACCCCAACCTGCCCTACCA						
CGGACT	29	530/600		2.9, 0.8		10±1
GGCAGGGTTGGGGTGACTAAAAA						
CCCTTAATCCCC	34	595/650		3.5, 1.3		64±1

Nevertheless, the observed charge and the number of metal atoms, even for purified samples, do not necessary relate to the metal core of the cluster responsible for the emission of the metal-ligand complex. This is largely due to polymer matrix, which can contain metal ions, as well as small dark clusters with a low absorption cross-section that do not participate in the absorption and emission of the complex. In this regard, the unique selectivity of the emitting complexes is provided by the fluorescence excitation spectra recorded over a wide spectral range. They seem to be an unambiguous tool, in combination with quantum mechanical (QM)/molecular mechanical (MM) calculations, for identifying the structure of the fluorescent centers of cluster-ligand complexes. Though, high level *ab initio* QM simulations of polymers complexes with metal clusters, which requires a lot of computational resources, remain a difficult problem. There is a limited number of studies on the absorption spectra of cluster-ligand complexes [134-137]. The calculated spectra, however, are far from the fluorescence excitation spectra of the complexes. As for free clusters, the calculation of their optimized structures and their spectral properties are widely represented in the literature [138-144]. Works, where the calculated excitation spectra show good agreement with experimental data, are particularly noteworthy. Fig. 1.2.3 shows an example of such calculations and experimental spectra obtained in an noble gas matrix at low temperature [138]. However, isolated free clusters tend to luminesce poorly. Based on a multitude of published data, it can be concluded that luminescent abilities are inherent in small clusters, in particular for silver clusters, mainly consisting of three atoms [145-148]. For DNA-stabilized clusters, it was noted [149] that a specific overall form of the excitation spectra of Ag clusters suggests an extended structure of the fluorescent clusters, in the excitation spectra of which there is only one pronounced intense low-energy transition up to the UV part of the spectrum (Fig. 1.2.4).

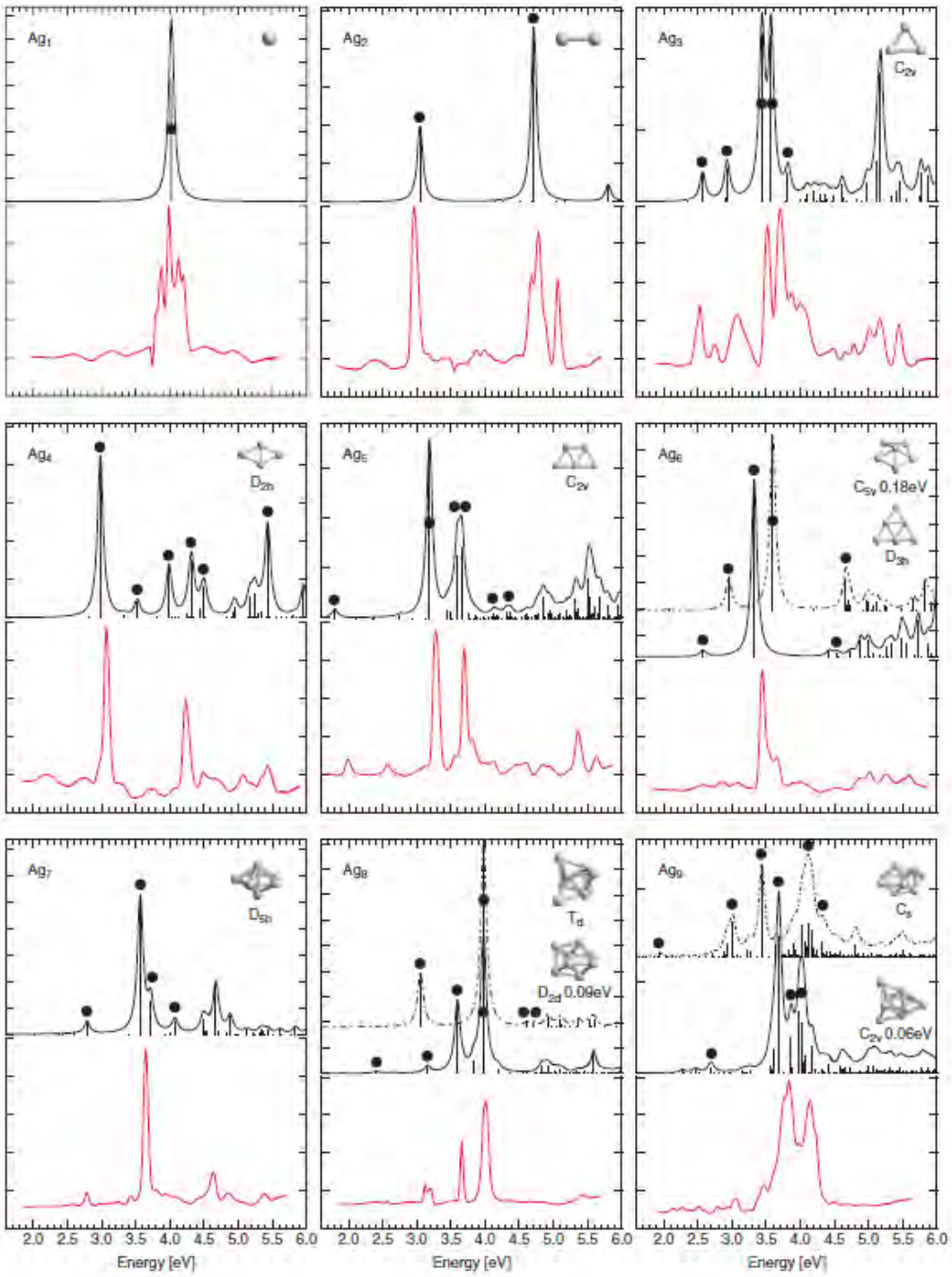


Fig. 1.2.3. Comparison between experimental and calculated absorption spectra of small Ag clusters [138].

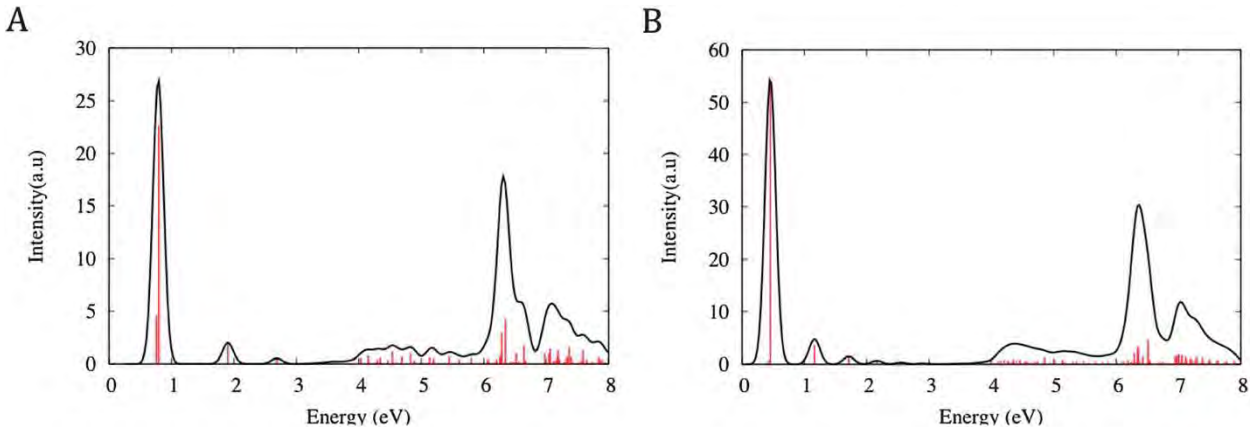


Fig. 1.2.4. Excitation spectra of (A) Ag_{20} nanowire and (B) Ag_{40} nanowire in [142].

Based on mass spectra (MS) analysis and on molecular dynamics (MD) simulations [149, 150], a rod-like structure of the clusters was proposed (Fig. 1.2.5, 1.2.6).

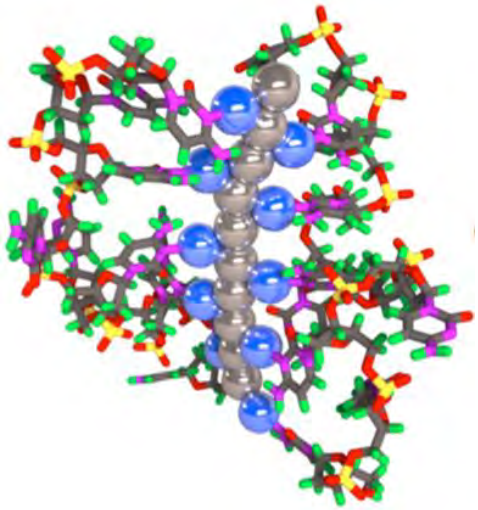


Fig. 1.2.5. The empirical structure of fluorescent clusters, proposed on the basis of mass spectrometric data of chromatographically purified samples. Ions are highlighted in blue, neutral silver atoms are in gray. The cluster in this model is represented as a neutral chain of atoms stabilized by two DNA strands with silver ions [149].

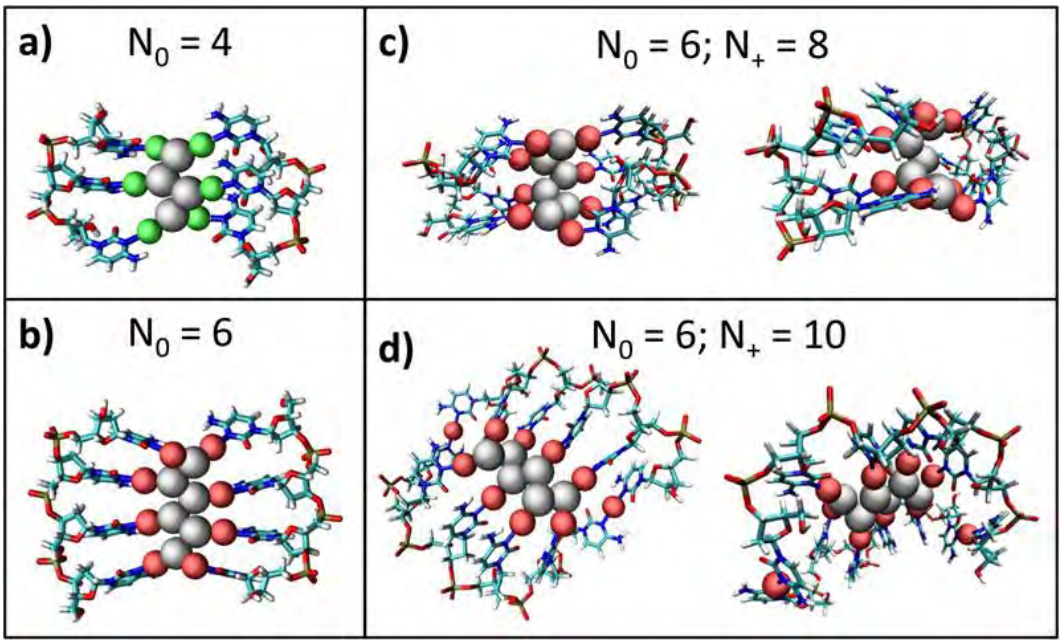


Fig. 1.2.6. Cluster models proposed on the basis of MD simulation [150]. Silver ions are highlighted in color. The numbers of neutral atoms and silver cations obtained on the basis of mass spectrometric data are indicated.

Nethertheless, the structures obtained using MD and their spectral properties were not proved by QM calculations. The detailed structure of fluorescent complexes of Ag and other metal clusters with polymers is still a difficult problem. The results of [151, 152] show that the double helix of DNA significantly reduces the yield of luminescent clusters. On the contrary, the presence of hairpins and unpaired bases (mismatches) in the DNA structures favors their formation. Fig. 1.2.7 shows various structures of oligomers that demonstrate different ability to form fluorescent clusters: clusters on a fully complementary double helix, hairpin structures with an A-loop and a T-loop do not fluoresce. Fig. 1.2.8 shows the structure of a fully complementary duplex and a duplex containing a CT non-complementary pair. In the absence of non-complementary pairs, fluorescent clusters are not formed.

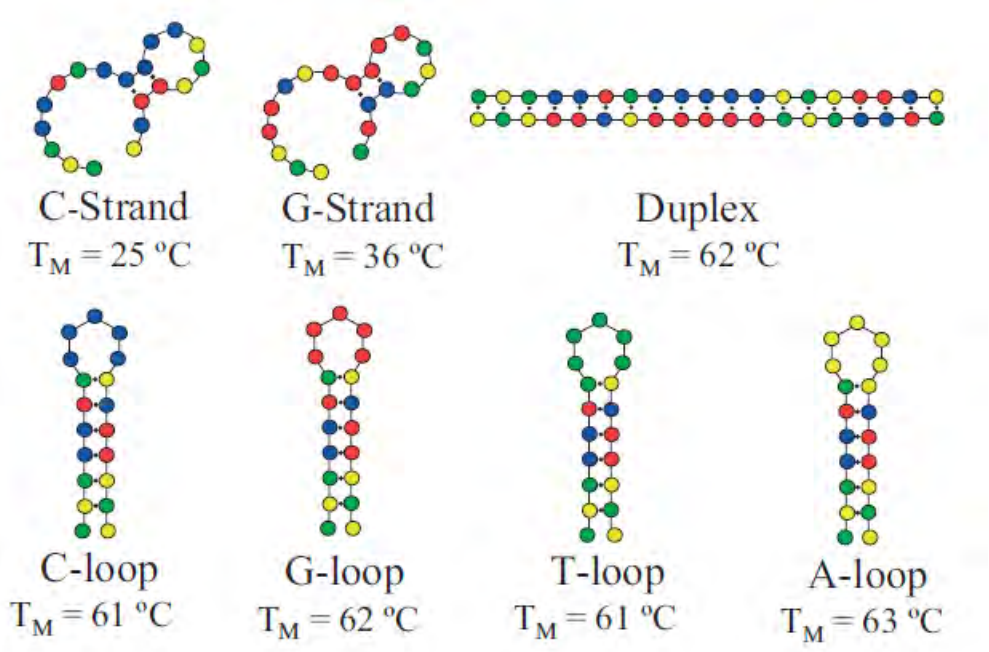


Fig. 1.2.7. Structures of the DNA oligomers exhibiting different abilities to form the fluorescent complexes with Ag clusters. Blue – cytosine (C), green – thymine (T), red – guanine (G), and yellow – adenine (A). The melting temperatures (Tm) are also indicated [151].

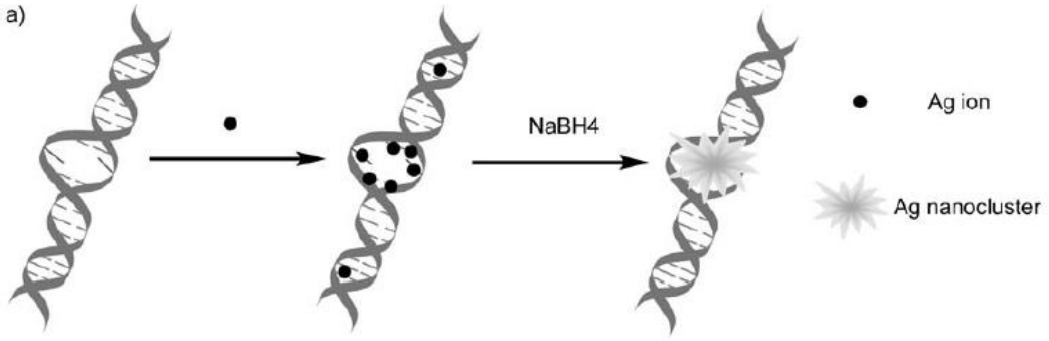


Fig. 1.2.8. Schematic representation of the site-specific DNA-programmed growth of fluorescent Ag nanoclusters [152].

As indicated above, at the first stage of cluster synthesis, a complex of DNA with silver ions is formed. Silver cations, however, can significantly change the initial (native) structure of DNA. The possibility of the formation of noncanonical pairs of C-Ag $^{+}$-C, G-Ag $^{+}$-G (Fig. 1.2.9), as well as the destruction of H-bonds of canonical base pairs can lead both to the formation of double-stranded regions and to their destruction [153-156].

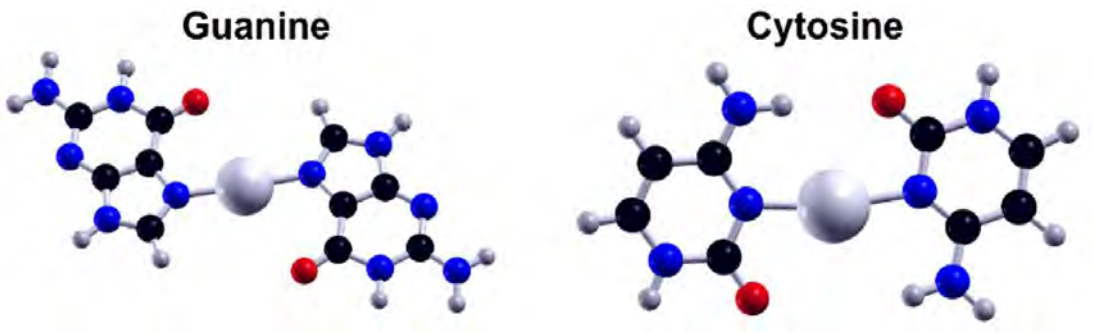


Fig. 1.2.9. Calculated ground state geometries of Ag+-mediated homo-base pairs [156].

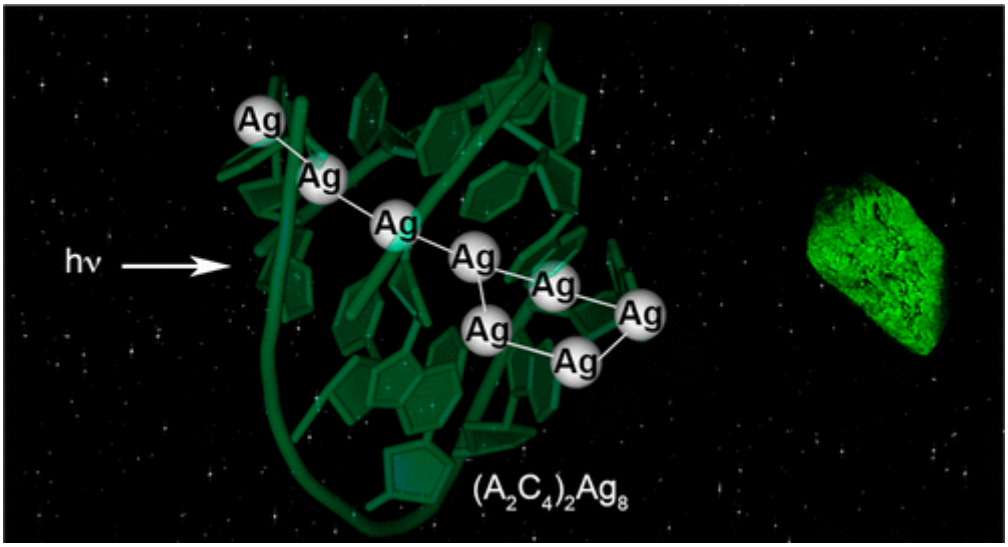


Fig. 1.2.10. Crystal structure of a luminescent silver cluster on DNA [158].

In recent studies, the Dickson group first presented detailed structures of DNA clusters: the structure of a dark non-luminescent cluster obtained from photoelectron spectroscopy [157], as well as the crystal structure of a luminescent cluster (Fig. 1.2.10)

[158]. In general, it is worth noting that there is currently no generally accepted clear idea about the structures of complexes of fluorescent silver clusters with DNA and the effect of DNA on their spectral properties. This problem was solved, in particular, in this dissertation.

A relatively large Stokes shift and the difference in the absorption and emission maxima are interesting characteristics of Ag-DNA clusters. The shift of 5600 cm^{-1}, for instance, is observed in a NIR-emitting Ag-DNA cluster [159]. A typical manifestation of substantial structural and/or solvent relaxation in an excited state is the large Stokes shift. How fast is this relaxation? The dynamic Stokes shift of Ag-DNA clusters observed in nanosecond time-resolved experiments [159-163] did not exceed 200 cm^{-1} in aqueous solution, meaning that the major relaxation occurs on the picosecond and/or femtosecond time scale. Figuring out the early emission dynamics after photoexcitation in the clusters is nessesary for the development of these systems for the applications requiring a decrease in nonradiative decay to increase the fluorescence quantum yield. The emission dynamics of Ag NCs on the femtosecond time scale, though, has hardly been studied. Dickson et al. [164] firstly performed the time-resolved experiments on the femtosecond time scale for Ag-DNA clusters. They proposed an energy diagram with four states for a cluster emitting in the red spectral range, basing on the transient absorption measurements. According to their data, the emissive state of the cluster forms in 350 fs. An ultrafast (of about ~100 fs) relaxation of the excited state of the NIR-emitting Ag-DNA cluster with the Stokes shift of 1000 cm^{-1} was observed by Thyrhaug et al. [165]. Do other Ag NCs with large Stokes shift behave the same? In general, it should be noted that the dynamics of excited states of the clusters have been little investigated. Specifically, little attention has been paid to the formation of dark states. Meanwhile, dark states in Ag nanoclusters stabilized by DNA are proposed to be used in optically modulated microscopy, which significantly increases detection sensitivity due to photoinduced relaxation of dark state (Fig. 1.2.11) [166].

A pump-probe technique is typically used to detect transient states of molecules. However, inhomogenious samples, low concentrations, multiple contributions from excited states absorption, stimulated emission, and relaxation processes may cloud the

data interpretation. Fluorescence saturation spectroscopy can serve as an alternative power tool for studying complex multicomponent mixtures of organic compounds [167]. In this work, saturation fluorescence spectroscopy along with traditional methods was used as methods for studying the dynamics of excited states of clusters and determining the photophysical constants of primary photoprocesses in complexes of clusters with DNA.

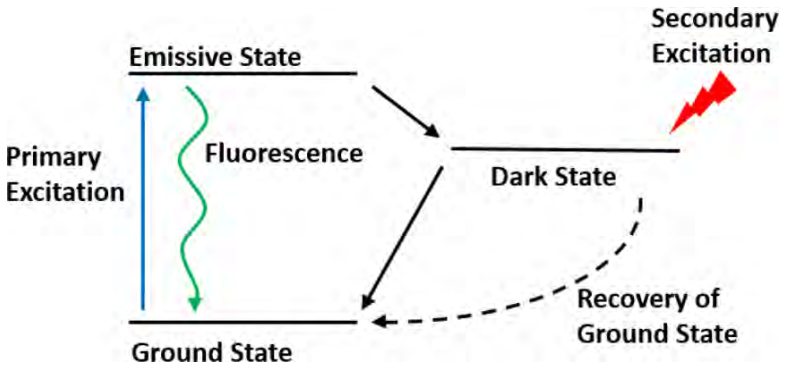


Fig. 1.2.11. The Jablonski diagram represents ground, emissive, and dark states for Ag cluster emitters. Excitation at 800 nm (red arrow) depopulates the dark state faster than its natural decay to recover ground state population more rapidly and increase overall fluorescence [166].

CHAPTER 2. EXPERIMENTAL AND THEORETICAL METHODS

2.1. Samples.

DNA samples. In experiments on the intrinsic luminescence of DNA components, the HPLC purified oligonucleotides from Syntol (Moscow, Russia), thymus DNA (CT DNA), deoxycytidine-5'-monophosphate (dCp) from Sigma-Aldrich were used. Solutions were prepared using milli-Q deionized water. In a typical sample preparation, DNA strands or monomers were dissolved in water (pH 6), mixed with the proper buffer, borate (pH 9) or citrate (pH 3) to maintain the required pH. For all samples, optical density at 266 nm was equal to 1 (a quartz cuvette with a pathlength of 4 mm) and to 1.5 (a rotating silica cell with a pathlength of 0.4 mm) in steady-state and time-resolved fluorescence measurements, respectively.

Synthesis of silver (Ag) clusters on oligonucleotides and CT DNA. Typically, oligonucleotides and silver nitrate ($AgNO_3$) aqueous solutions were mixed and stored for 10 min at room temperature. Then borohydride ($NaBH_4$) solution was added, followed by vigorous stirring. The found optimal final concentrations are shown in Table 2.1.1.

Ion Pair-Reversed Phase HPLC of the green-emitting Ag cluster on the 15-mer and the red-emitting cluster on the 12-mer was performed on C18 column (Supelco Discovery 250 x 4.6 mm, 5 μm; gradient B in A 1-50% in 30 min; A − 70 mM triethylammonium acetate aqueous buffer (pH 7,5); B − 70 mM triethylammonium acetate in methanol). The corresponding chromatograms are presented in Fig. 2.1.1.

Table 2.1.1. DNA matrices and optimal synthesis parameters for luminescent silver clusters on them.

Matrix/color of the luminescence cluster	$AgNO_3$, μM	$NaBH_4$, μM	DNA, μM	T, C^0	Synth. time	Solvent, pH
CT DNA (denatured in a water bath)	24	10	40 μg/mL	21	1 week	water, 5 mM $NaNO_3$ pH 6
5'-CCTCCTTCCTCC-3'/red	120	30	20	20	1 day	citrate buffer, pH5
5'-CCTCCTTCCTCC-3'/green	120	30	20	20	1 week	water, pH 6
5'-CCTCCTTCCTCC-3'/violet	120	30	20	20	2 months	water, pH 6
5'-CGCCCCCCTCGGCGT-3'/green	150	75	25	20	4-8 hrs	Amm. acetate buffer, pH 7
5'-CGCCCCCCTCGGCGT-3'/blue	150	75	25	37	3 hrs	water, pH 6

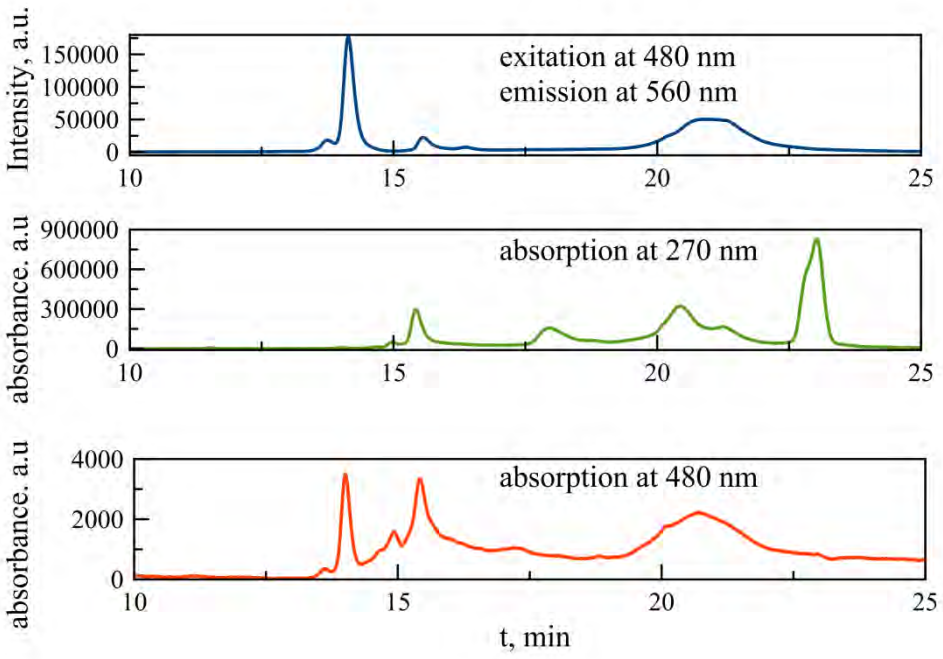


Fig. 2.1.1. HPLC chromatograms obtained using the luminescence (top) and absorbance at 270 nm (middle) and at 480 nm (bottom) for Ag clusters on the 15-mer DNA. The luminescent complex elutes at 14.2 minutes [56].

2.2. Experimental methods.

Steady-state luminescent, absorption, CD spectroscopy in UV and visible spectral regions. The fluorescence, excitation, and polarization spectra of the samples were recorded on the Fluorolog 3 spectrofluorimeter (Horiba Jobin-Yvon). All spectra were acquired using a 4-mm quartz cuvette at right angle to the excitation beam. The scattered light was removed using the appropriate long-wavelength filters. Commonly, the spectral bandwidths from 2 to 5 nm were used, the spectra were recorded with a step of 1 nm with an accumulation time of 0.1 to 1 s per point and averaged 1-4 times. To obtain an acceptable signal-to-noise ratio, all parameters were optimized depending on fluorescence intensity of the samples. Fluorescent emission spectra were corrected taking into account the device sensitivity provided by manufacturers. The correction has been verified as described below. It should also be noted that the observed intensities of the excitation spectra can be affected by the difference in emission polarization [168]. A

vertically oriented polarizer in the excitation channel was used, and the other polarizer was placed at the “magic” angle in the emission channel to avoid possible errors.

Three major factors, which were taken into account when recording and processing the spectra, are included in the correction of the fluorescence excitation spectra.

1) As a rule, part of the light from the beam splitter enters the photodiode in the reference channel, at the output of which the reference signal (R) is formed. The signal (S) from the main photomultiplier is divided by into a reference signal. The S/R ratio is then corrected for spectral sensitivity of the beam splitter and photodiode. The correction provided by the manufacturer was verified by comparing the excitation spectrum of the diluted ethanol solution of rhodamine 6G ($D_{530\ nm}$< 0.01) with its absorption spectrum (Fig. 2.2.1). The absorption spectrum was measured using the Lambda 1050 (PerkinElmer) two-beam scanning spectrophotometer in a 4-mm quartz cuvette (Quartz Suprasil, Hellma Analytics).

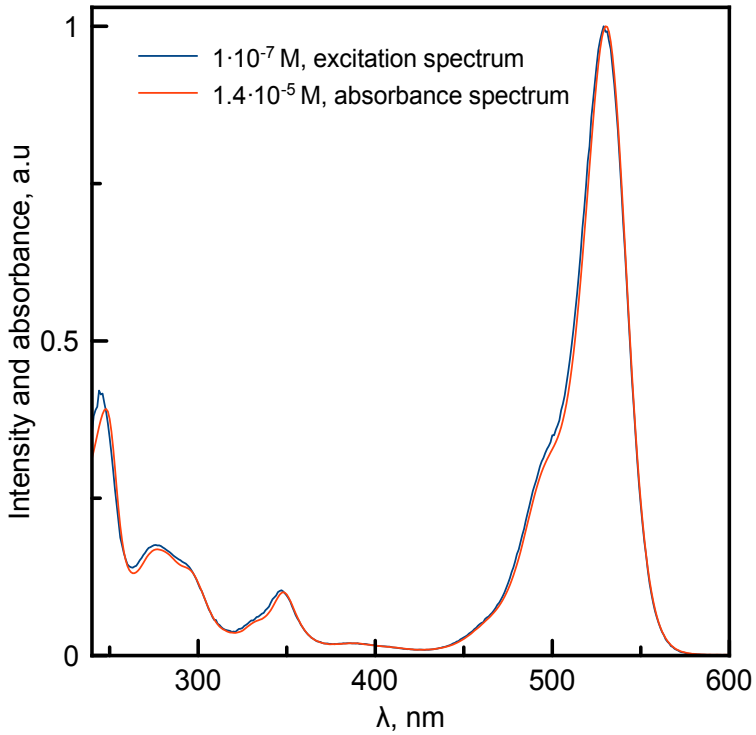


Fig. 2.2.1. Excitation spectrum of $1 \cdot 10^{-7}$ M rhodamine 6G (λ_{em} = 640 nm) and absorption spectrum of $1.4 \cdot 10^{-5}$ M rhodamine 6G in ethanol solution [56].

As one can see, the absorption spectrum is in good agreement with the excitation spectrum in the range from 250 nm to 600 nm. Thus, the device correction provided by the manufacturer was used to record the excitation spectra without additional corrections.

2) The monochromator and photomultiplier are sensitive to polarization of incident light. The fluorescence polarization anisotropy of the samples may differ significantly in UV and visible range, which leads to a distortion of the excitation spectrum. Two polarizers in the excitation and emission channels were installed at the “magic” angle to exclude the polarization effects [168]. By means of the polarizer transmittance spectrum recived as the ratio of the excitation spectra of rhodamine 6G with and without polarizer in excitation channel, a correction for the polarizer absorption was also made (Fig. 2.2.2).

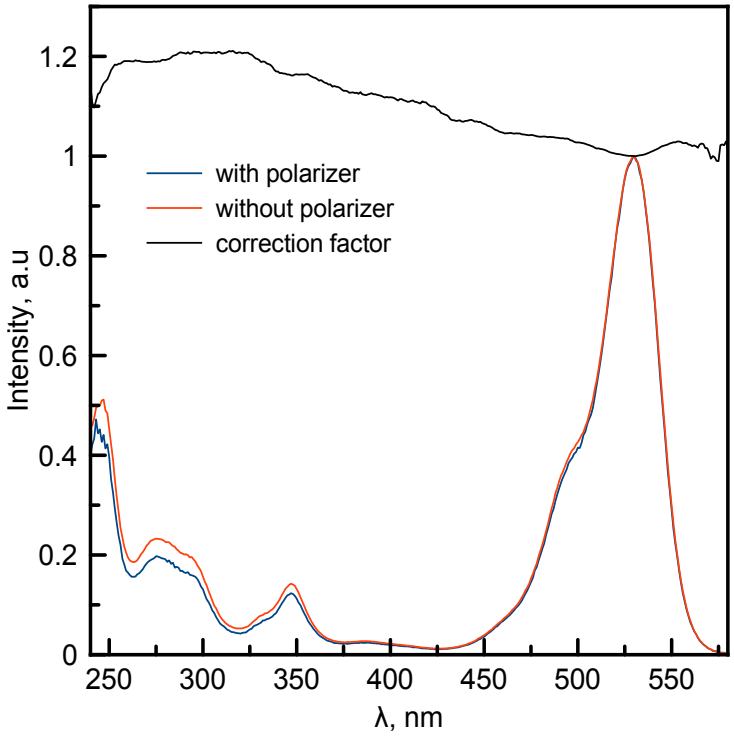


Fig. 2.2.2. Excitation spectra of $1.4 \cdot 10^{-5}$ M rhodamine 6G (λ_{em} = 640 nm) recorded with and without a polarizer in the excitation channel, and the calculated correction factor [56].

In such a case, the fluorescence is completely depolarized and the difference between the spectra is caused by the polarizer absorption in UV region. The correction factor

obtained in this way as the ratio of the spectra was additionally applied to all recorded excitation spectra.

3) The absorbance of solutions was usually in the range of 0.2 – 0.4 in 4-mm cuvette. The inner filter effect should be taken into account in this case. The excitation spectrum of $1.4 \cdot 10^{-4}$ M rhodamine 6G solution corrected by the standard Eq. (2.2.1) [169],

$$I_{corrected} = \frac{I_{measured} \cdot 2.303 \cdot D}{1 - 10^{-D}} \qquad (2.2.1),$$

demonstrates a minor deviation from the spectrum obtained for the diluted solution (D< 0.01), while the spectrum corrected using (2.2.2) coincides with the spectrum for the dilute solution (Fig. 2.2.3).

$$I_{corrected} = \frac{I_{measured} \cdot 2.303 \cdot D \cdot 0.75}{1 - 10^{-D \cdot 0.75}} \qquad (2.2.2).$$

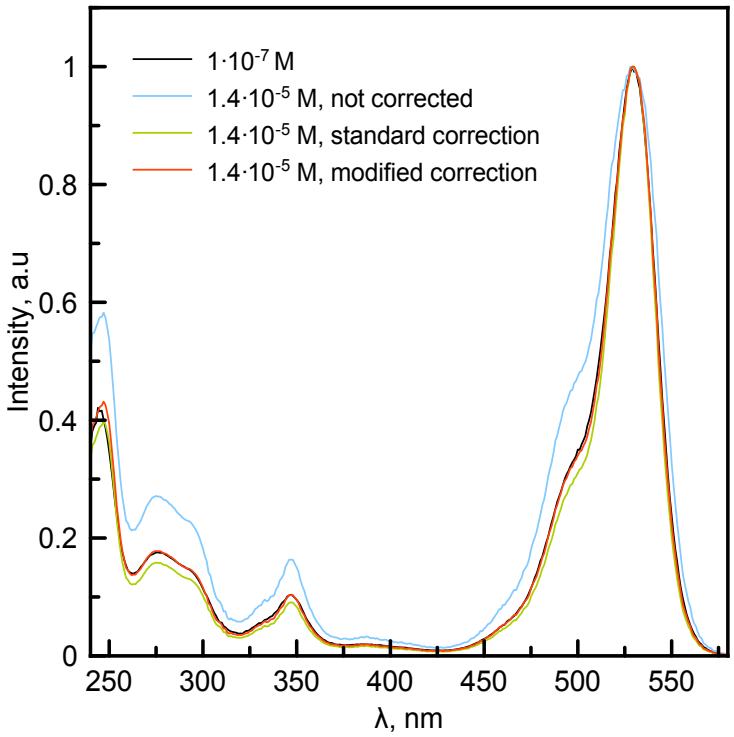


Fig. 2.2.3. Fluorescence excitation spectra of $1.4 \cdot 10^{-5}$ M rhodamine 6G solution: uncorrected, corrected according to the standard Eq. (2.2.1) and the modified Eq. (2.2.2); excitation spectrum for 10^{-7} M rhodamine 6G solution (λ_{em} = 640 nm) [56].

This fact point out that in our case the most of light is collected from the first 3/4 of the cuvette pathlength, which decreases the effective absorbance. Thus, Eq. (2.2.2) was used to correct the excitation spectra for the inner filter effect.

The degree of fluorescence polarization was calculated as $(I_0 - G \cdot I_{90})/(I_0 + G \cdot I_{90})$, where I_0, and I_{90} are the emission intensities with vertical and horizontal polarization, respectively, at vertically polarized excitation light, and G is the instrument factor calculated as I_0/I_{90} at horizontally polarized excitation light.

CD spectra were recorded on the Jasco J-815 spectropolarimeter. Absorption spectra and melting curve were obtained with the Specord 210 Plus spectrophotometer equipped with the Peltier cooled cell holder and stirrer.

Mass spectrometry. Mass spectrometry measurements were carried out on the Bruker Daltonik GMBH spectrometer. Capillary voltage was set to 4.0 kV. The source temperatures were set to 180°C. Mass spectra were collected over the range of 300-2900 *m/z* in ESI negative mode. 800 mM 1,1,1,3,3,3 hexafluoro-2-propanol stock solution was adjusted to pH=7 by triethylamine, and then was two-fold diluted with the sample for further measurements. 30-200 μM DNA concentrations were used. The measured charge state z and ion mass m were determined from the isotope peak envelope. The number of silver cations (Ag number) N is determined by $N=(m-W-z)/(m_{Ag}-1)$, where W is the molecular weight of the unionized DNA strand, m_{Ag} is the atomic weight of silver.

Time-resolved spectroscopy. The fluorescence time-resolved measurements on a femtosecond time scale were made with the FOG 100-DX fluorescence up-conversion spectrometer equipped with second (400 nm) and third (266 nm) harmonic generators (CDP Corp., Moscow, Russia). DNA samples were excited by the third harmonic (266 nm) of a mode locked Ti–sapphire laser (TISSA, CDP Corp., Moscow, Russia) operating at 86 MHz. 10 mW UV output beam of 3 mm in diameter was focused by a 100-mm lens. Temporal scans were made in 2-50 ps time windows with the step of 78 fs and integration time of 1-5 s to get the appropriate signal-to-noise ratio. Solutions ($5 \cdot 10^{-4}$ M DNA) were placed into a 1-mm rotating quartz cell. All measurements were performed at room temperature. Photodegradation of the samples was less than 5%

during a single scan. The apparatus function (IRF) was determined by measuring the signal of the Raman line in water. The FWHM of IRF was typically less than 350 fs. A nonlinear fitting procedure was performed using up to three-exponential functions convoluted with the Gaussian apparatus function. In the case of Ag clusters on the 15-mer DNA, the excitation was made by the second harmonic of a mode locked Ti–sapphire laser (Synergy 20). The FWHM of IRF was typically less than 200 fs. The luminescence decay curves on the nanosecond time scale were obtained by the TCSPC method on the Fluorolog 3 spectrofluorimeter. Laser diodes with a FWHM of about 1 ns were used as an excitation source.

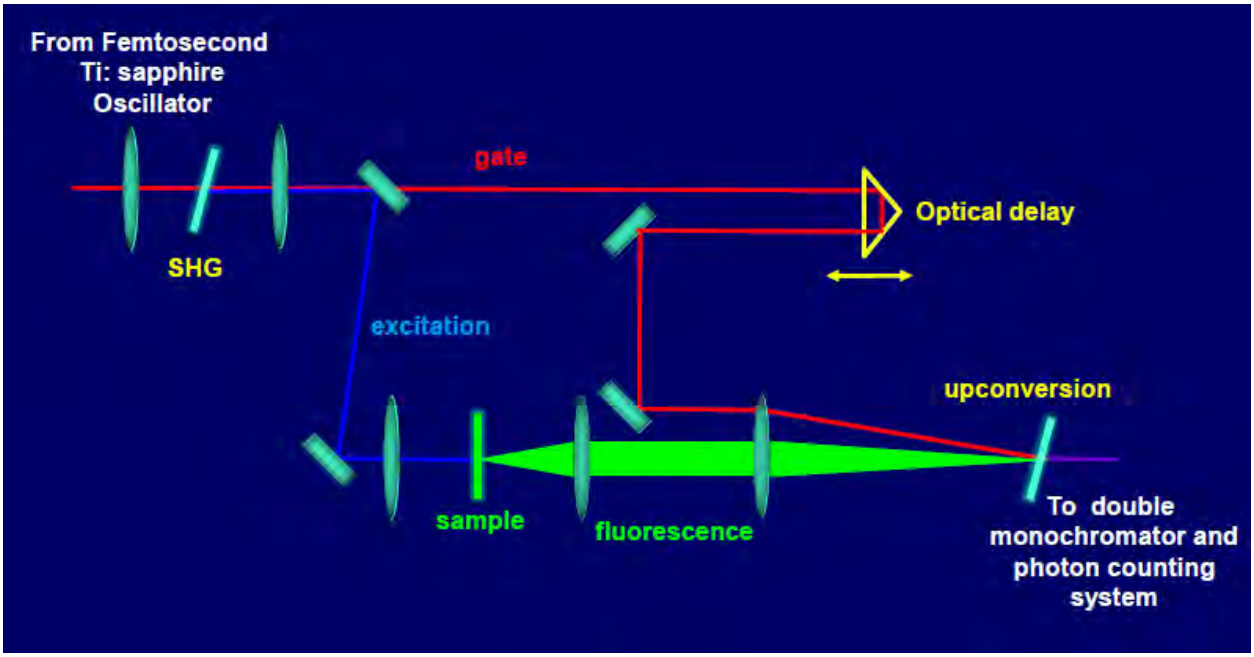


Fig. 2.2.4. The main optical elements of the FOG 100 up-conversion spectrometer. The principle of the setup operation can be found elswere [168].

Fluorescence saturation spectroscopy. Fluorescence saturation curves were obtain using the diode pumped 800-nm femtosecond laser (Synergy 20) combined with an amplifier chain (Pulsar 10 mJ, Amplitude Technologies). Laser pulses of 10 mJ with 10 Hz frequency were directed into an optical parametric amplifier (OPA), which gave an output pulse energy of about 100 mkJ at 530 nm. In order to avoid stimulated emission from the sample, the pulse was stretched up to approximately 1 ps. The output beam

was limited to a diameter of 2.5 mm using a diaphragm. We used a Q-switched frequency-doubled Nd:YAG laser ("Quantel", 532 nm, 10 ns pulse, 10 Hz, 100 mJ) for nanosecond pulse excitation. In both cases, the sample luminescence in a 1×0.4 cm cuvette was collected at right angle using a portable spectrometer ("Ocean Optics"). To remove the scattering light, a long pass filter was used. The excitation intensity was attenuated by neutral filters and was measured at the output by a pyroelectric energy meter ("Gentec-EO"). While the experiments, solutions were extensively stirred and the photobleaching did not exceed 20 % in the case of nanosecond pulse and 5 % in the case of picoseconds pulse excitation, which was determined by fluorescence measurements of the samples before and after the experiment. We solved the system of equations (see Chapter 6) and numerically integrated the population of the excited state with the step of $2 \cdot 10^{-14}$ s^{-1} via Runge–Kutta formalism realized in MatLab, to simulate curves in the nanosecond excitation mode. The parameters were varied with appropriate step to fit the experimental points the best way using RMSD criterion. In the case of continuous excitation (CW) excitation, a pump laser (Finesse, Laser Quantum) with an output power of 2 W at 532 nm was used. The beam was limited by the diaphragm of up to 2 mm. Excitation was carried out by the short (~0.2 s) single pulses in order to avoid photobleaching of the samples. Integral fluorescence was measured with the use of a photodiode.

XPS measurements. Thin films of DNA-silver complexes were obtained by depositing a few drops of the solution on a freshly cleaved surface of highly oriented pyrolytic graphite (HOPG), followed by drying with argon or nitrogen. For each sample, deposition/drying cycle was usually repeated 2-3 times to obtain films thick enough to exclude the signal from the HOPG substrate in the photoemission (PE) spectra, but at the same time thin enough to prevent overcharging of the samples. In order to minimize surface contamination, cleavage and deposition of the sample, as well as its transfer into vacuum chamber, were carried out in argon or nitrogen atmosphere.

The spectra of DNA and DNA complexes with silver cations and nanoclusters were measured on the ESCALAB 250Xi X-ray photoelectron spectrometer equipped with a monochromated Al K_α X-ray source. Measurements were carried out at several points

on the surface of each sample to confirm the homogeneity of the samples. No significant changes in XPS spectra were observed during rescanning, indicating that the DNA samples were quite stable under the X-ray flux. The stoichiometry of the obtained films was controlled in accordance with the approach developed in the literature of quantitative XPS measurements, based on a comparison of the relative intensities of the core-level signals [170]. Spectra were approximized using the Gaussian-Lorentian functions with a simultaneous background optimization. All the binding energies of the photoemission peaks are given with an accuracy of ±0.1 eV.

2.3. Theoretical methods.

Molecular dynamics (MD) of DNA. MD simulations of single-stranded $(dT)_{18}$ oligomer were performed with the Gromacs 4.5.5 [171] program package with the AMBER parmbsc0 force field [172]. The model for the DNA solution used periodic boundary conditions for a cubic box of 14x14x14 nm and an explicit TIP3P water solvent. Negatively charged phosphate groups of DNA were neutralized by the corresponding number of Na^+ counterions. We also added 30 ion pairs of NaCl as ca. 50 mM background electrolyte. The particle mesh Ewald (PME) algorithm [173] was used for calculation of long-range electrostatic interactions. MD was performed in the NVT ensemble using the Parrinello-Raman thermostat with a 2-fs integration step. The trajectory frames were written every 24000 integration steps. All H-bonds were constrained using the LINCS algorithm [174]. After 10 ns of heating up the whole system to 350 K and equilibration, MD simulations for 30 ns at 310 K were performed to sample the conformational space of the DNA.

Calculating DNA excitation spectra. The structures of the nucleobase homodimers and the i-motif tetramer were derived from the PDB structures of DNA motifs and from the time-frames of MD trajectories. The monomers were optimized and then inserted into an arrangement of the initial PDB dimer geometries. Monomer geometry was optimized using the second-order Møller−Plesset perturbation theory (MP2) [175] and also aug-cc-pVDZ basis [176] realized in the ORCA software package [177]. In our

calculations, we used 9-methyladenine as an adenine monomer, 1-methylcytosine as a cytosine monomer, and 1-methylthymine as a thymine. In the case of i-motif tetramer, we use cytosine as a monomer unit instead of 1-methylcytosine when calculating the excitation spectra. Electronic excitation spectra were calculated using various high-level methods for "vacuum": by CIS method taking into account doubly excited configurations according to the second-order perturbation theory CIS(D) [178]; by CC2 coupled cluster method taking into account single and double excitations [179], by ADC(2) second-order algebraic diagrammatic construction [180] with the use of "resolution of the identity" (RI) [181]. Electronic densities were calculated in the ORCA software package. Analysis of the transition density matrix in the atomic orbital basis was performed in the TheoDORE package [182] using the following descriptors [183]: PR is the participation coefficient representing delocalization; CT is the the total amount of transferred charge (including charge resonance and directed transfer contributions); and CTnet represents the net charge displacement. CIS(D) calculations were performed in ORCA, CC2 and ADC(2) calculations were performed in TURBOMOLE [184]. In the case of semi-protonated cytosine tetramer, the implicit *COSMO* solvent model was used.

QM/MM simulations of Ag-DNA complexes. The equilibrium structure of the Ag^+–DNA complex was obtained using QM/MM (quantum mechanical/molecular mechanical) geometry optimization of the Ag ion–containing DNA duplex in solvent using the CP2K program [185]. The C-Ag^+-C pairs were taken in *trans* configuration, since it is more energetically favorable [154]. The QM part of the system included the nucleobases and Ag ions, while the MM part consisted of the sugar-phosphate DNA backbone, as well as sodium (Na^+) ions as counterions. The parmbsc0 force field, periodic boundary conditions, and the TIP3P water model were used in the MM part. Geometry relaxation in the QM part was carried out using pseudopotential plane-wave density functional theory (DFT) in reciprocal space, namely, the Göedecker-Teter-Hutter pseudopotentials (GTH) [186] for atomic core electrons, the molecularly optimized DZVP-MOLOPT-GTH [187] basis set for valence electrons, and the GGA (generalized gradient approximation) of the PBE functional [188]. The full charges of

the QM and MM parts were equated to zero by removing redundant Na^+ ions. In the case of the 12-mer DNA, MD of the entire system was performed for 2 ps using the NPT ensemble at 300 K with an integration step of 2 fs and restrictions on the H-bonds. At the final stage, the entire QM/MM system was optimized starting with the last MD step. Similar calculations were performed with the addition of Ag atoms.

We found that the geometry optimization approach can strongly affect the excitation spectra of the complexes [54]. Before calculating the spectra, we performed additional optimization for the QM region of the Ag-DNA system using the hybrid DFT functional PBE0 [189], the def2-SVP [190] basis set and polarized continuum model of solvent implemented in Firefly v.8.0.1 program [191], since the electronic spectra are sensitive to the geometry of the complexes. For this, the coordinates of the carbon atoms of the methyl groups of 1-methylcytosine and 1-methylthymine, which simulate the carbons of the sugar-phosphate backbone, were fixed.

Calculating excitation spectra of the Ag clusters. We calculated electronic excitation and excitation anisotropy spectra for the gas phase and all the obtained equilibrium structures of the complexes of a silver cluster bound to the nucleobases. We estimated various ab initio and TDDFT methods for calculating the excitation energy of pyrimidine complexes with Ag clusters [54]. We studied the spectra obtained by the CIS, CIS(D), CC2, ADC(2), and TDDFT methods using various hybrid–GGA and meta–hybrid–GGA functionals. We discovered that the M06–2X functional [192] demonstrates high accuracy in comparison to the ADC(2) ab initio method. Thus, TDDFT method (at the M06-2X/def2-SVP level) was used along with ADC(2)/def2-SVP method [51, 52, 56]. The spectra were calculated using the Turbomole program. Fluorescence anisotropy for each absorption transition was calculated according to a formula $r=(3\cos 2\alpha - 1)/5$ [168], where α is the angle between the S_0-S_1 and S_0-S_n absorption transition dipoles. The total anisotropy was calculated by summing all absorption transitions weighted in accordance with their relative contribution at given wavelength. To take into account the rotational motion of the complexes, an empirical scaling factor was also introduced.

Calculating excitation spectra of free Ag clusters. The geometry of the ground and excited states was optimized in DFT realized in GAMESS US program [193]. The relativistic effective core potential (RECP) for 28 inner electrons was used for silver atoms [194]. A valence double-zeta polarization basis 6-31g* was used for the remaining atoms [195]. The rPBE [196] functional was used to optimize the ground state geometry. Geometry optimization of free clusters and cluster-base complexes was carried out in “vacuum” without any limitations. The one-dimensional gradient optimization was used for thread-like free clusters . The excitation spectra were calculated by the TD DFT B3LYP/LANL2DZ/6-31g* method [197].

CHAPTER 3. LOW-ENERGY ELECTRONICALLY EXCITED STATES IN DNA

The conformational heterogeneity of NAs leads to the spectral heterogeneity observed in the action [22], fluorescence [82] and fluorescence excitation spectra of NAs [65, 96]. Low-energy EES, experimentally observed in the spectra, as well as the strong dependence of the exciton splitting value on the interplanar distance of nucleobases, predicted by theoretical estimates [60], suggest the possibility of existence of base stacking conformations with low-lying EES in the region of the long-wavelength edge of the DNA absorption band. To understand the nature of such stacking conformations with low-lying EES, theoretical estimates of the energies of EES bases in various forms of stacking were made [49]. These results are described in this chapter of the dissertation.

3.1. Calculations of the electronic excitation spectra of DNA monomers and B-form dimers of DNA bases.

To select the optimal method for calculating the spectra of nucleobase stacked dimers in various conformations in the DNA structures, we performed a benchmark study of single DNA bases and base stacked dimers using various calculation methods and basis sets. The influence of the basis and the method on the position of the first $\pi\pi^*$ transition in the monomer and its splitting in the dimer was analyzed. Dimer structures were taken from the PDB database. Figs. 3.1.1-3.1.3 show the structures of the dimers of thymine, adenine, and cytosine taken from X-ray structural data for DNA molecules in B-form. The figures also indicate two structural parameters used in further analysis: the distance between the midpoints of the bonds C6 – C5 (d) and the dihedral angle C5 – C6 – C6 – C5 (η).

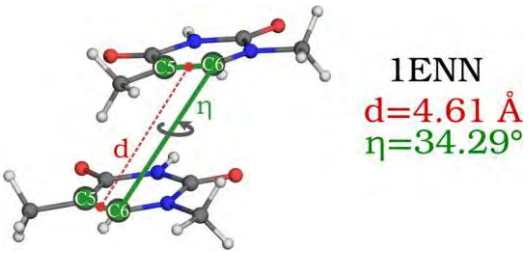


Fig. 3.1.1. Thymine stacked dimer in the B-form of DNA, PDB ID: 1ENN [198].

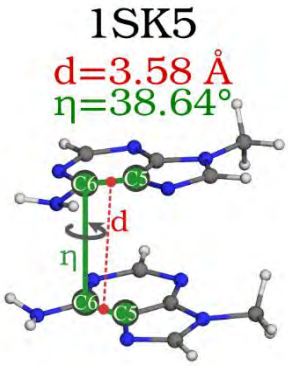


Fig. 3.1.2. Adenine stacked dimer in the B-form of DNA, PDB ID: 1SK5.

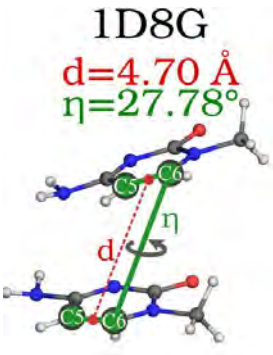


Fig. 3.1.3. Cytosine stacked dimer in the B-form of DNA, PDB ID: 1D8G [199].

In the calculations, the CIS (D), ADC (2), and CC2 methods were compared; the basis sets cc-pVDZ, TZVP, 6-311 ++ G **, aug-cc-pVDZ and aug-cc-pVTZ were used. The above calculations show that [49]: (1) an increase in the basis and complication of the method lead to a long-wavelength shift of the maximum of the intense ππ * transition, energy of which approaches experimental maximums; (2) the magnitude of the exciton splitting in the spectra of dimers is practically independent of the methods used.

3.2. Analysis of the conformation effect on the excitation spectra of thymine dimers.

First, we obtained the distribution of thermally accessible thymine dimer conformations at different values of d and η for $(dT)_{18}$ oligonucleotide. The obtained distributions are shown in Fig. 3.2.1-3.2.3. Our results are very similar to that obtained earlier [91, 200] with somewhat different computation protocols. The number of conformations within the range of d≲3.6 Å (dashed line in Fig. 3.2.1) is about 5%, which is in agreement with previous estimation. As already proposed [91, 200], this fraction of the stacked bases can be referred to as dimerizable dimers, since the experimental quantum yield of CPD formation is also a few percent in magnitude [99]. Then we calculated the electronic spectra of the dimers in a wide conformational range.

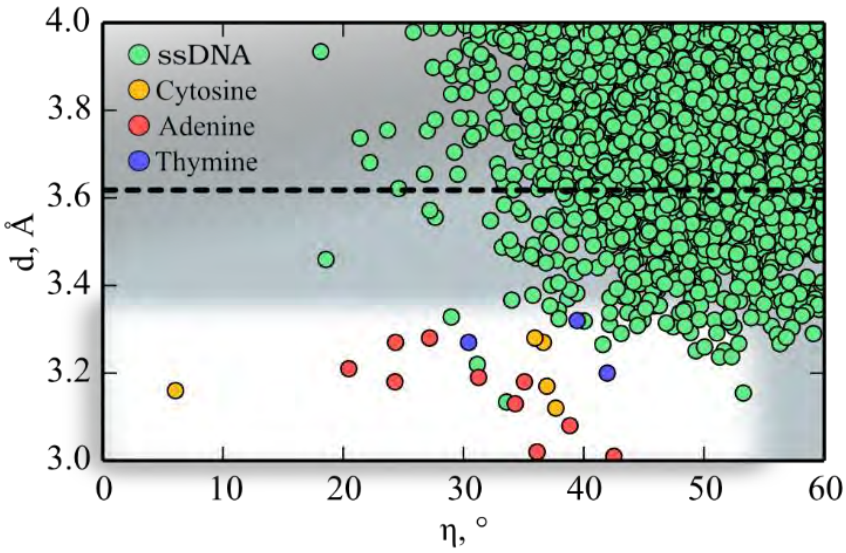


Fig. 3.2.1. Distributions of thymine dimers at different values of d and η for $(dT)_{18}$ oligonucleotide obtained from MD simulations. The dots indicating d and η for selected thymine, adenine, and cytosine dimers in non-canonical stacking geometries exhibiting the lowest ππ* states red-shifted by 0.4-0.6 eV from the corresponding B-form maxima are also plotted [49].

It appeared that all the thymine dimers obtained from MD trajectories within the conformational range of approximately d≲3.3 Å and η≲50° (highlighted area in Fig.

3.2.1) and able to produce the *cys-syn* isomer [201] of CPD, exhibit electronic transitions red-shifted by ≥0.4 eV from the absorption maximum of canonical B-form dimer.

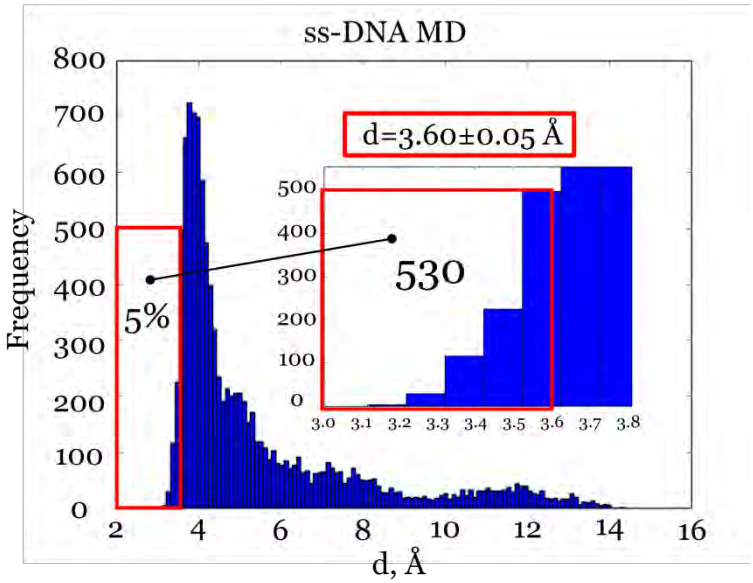


Fig. 3.2.2. Distribution histogram of thermally accessible thymine dimer conformations at different values of d [49].

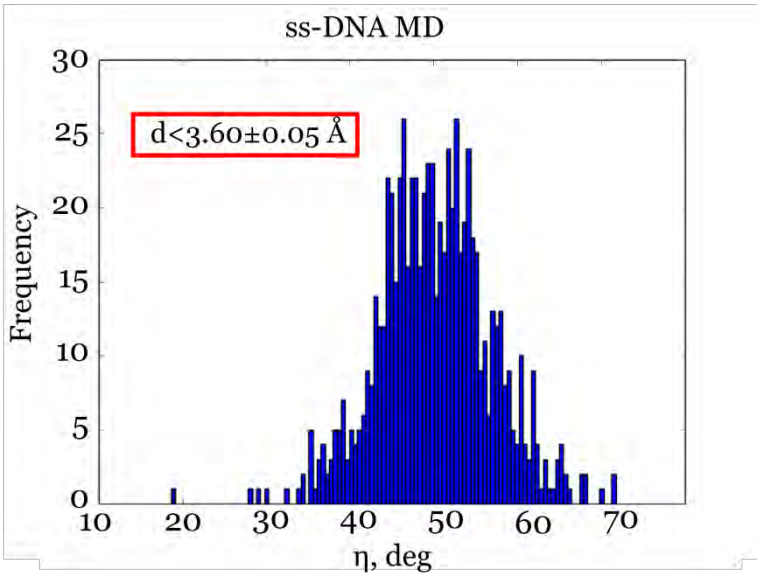


Fig. 3.2.3. Distribution histogram of thermally accessible thymine dimer conformations at different values of η in the case of d<3.6 Å [49].

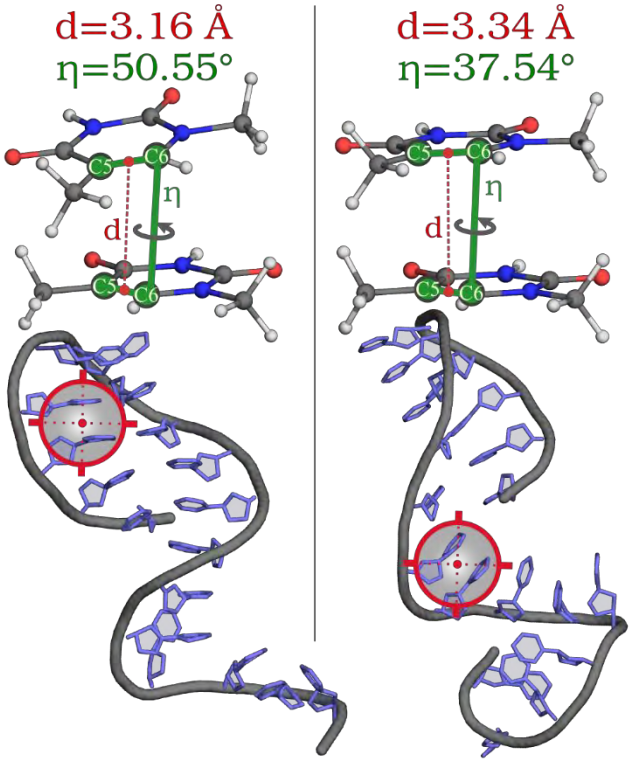


Fig. 3.2.4. Structures of the thymine dimers from 196th (left) and 518th (right) frames of MD simulation of ssDNA [49].

Fig. 3.2.4 presents examples of two structures containing thymine dimers with reduced interbase distances found in MD trajectory of $(dT)_{18}$. Our calculations show that the value of this shift is practically independent of the computation approach used (Table 3.2.1). Although more complicated basis set and computation method tend to shift the transitions to lower energies, thus approaching the position of the maximum to the experimental value [49], the exciton splitting and the relative shift of the lowest $\pi\pi^*$ state remains the same with accuracy of 0.05 eV (Table 3.2.1). In principle, it is not surprising, since it was demonstrated that absolute values of the exciton splitting in the dimers with face-to-face geometry, calculated in a wide range of inter-base distances and rotation angles, are practically independent of the *ab initio* method with accuracy of about 0.05 eV [60]. Here we show that the relative position of the lowest state is also independent of the computational approach in a wide range of conformations. The agreement with experimental results can be improved by using a more complicated

computational approach and also including environment interactions and considering vibrational effects on the absorption spectrum [28].

Table 3.2.1. Vertical excitations energies (in eV) for the 4 lowest excited singlet states of thymine monomer and thymine dimers in various stacking geometries obtained using CIS(D) (first row), ADC(2) (second row) and CC2 (third row) with the aug-cc-pVDZ basis, the shift of the lowest ππ* state relative to the B-form dimer [49].

	nπ*	nπ*	ππ*	ππ*	Shift
Thymine		4.92		5.07	
		4.53		4.80	
		4.78		4.91	
1ENN	4.83	4.86	4.98	5.08	
	4.44	4.45	4.68	4.81	
	4.70	4.71	4.80	4.91	
518 fr. MD	4.77	4.80	4.64	5.08	0.44
	4.35	4.38	4.32	4.80	0.47
	4.60	4.63	4.44	4.91	0.47
1BAE	4.74	4.76	4.69	5.08	0.39
	4.31	4.33	4.42	4.78	0.37
	4.58	4.62	4.48	4.90	0.42

As was noted above, interaction of adjacent bases and hydrogen bonding in the duplex practically do not affect the position of the lowest-energy ππ* states (within 0.05 eV) [23, 27]. QM/MM calculations performed for B-DNA duplexes in solution predict ca. 0.1 eV [94] and 0.4 eV [28] red shifts of the spectra of adenine and adenine-thymine dimers, respectively, relative to vacuum. The exciton splitting, however, remains the

same [94]. One can reasonably assume that the environment affects the B-form and the distorted dimers equally. Such approximation, however, should be tested by further QM/MM studies. In our study, we did not include the environment in the model, since we were interested in the impact of geometry factor on the shift of the lowest exciton state rather than the environment effects and the absolute values of the energies.

Fig. 3.2.5 demonstrates the exciton splitting of the thymine ππ* and nπ* states in various stacked conformations of the dimer. It should be noted that the splitting turns out to be essentially asymmetric, which increases the effect of shifting the low-energy state to the red side. We do not further analyze the low-intensity nπ* states in the dimers, since they are usually blue-shifted in polar environment relative to the gas phase and do not make a significant contribution to the absorption spectra.

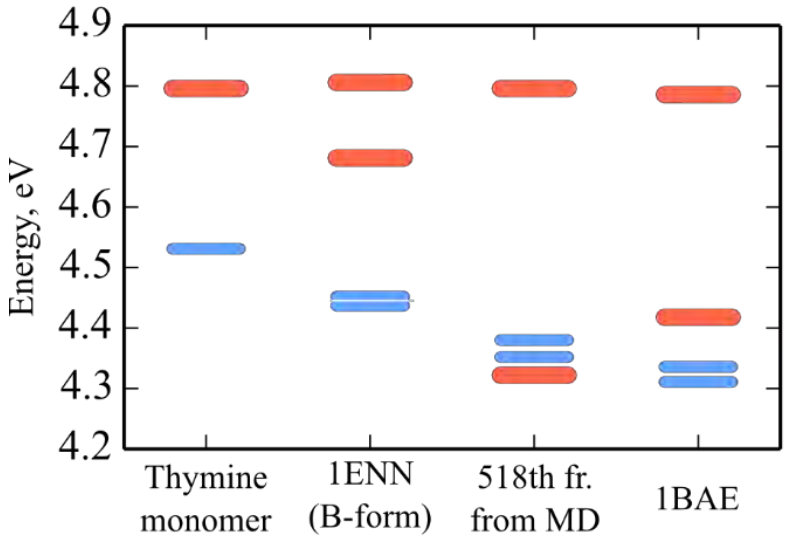


Fig. 3.2.5. Diagram illustrating the splitting of nπ* (blue) and ππ* (red) excited states in the stacked thymine dimers at different geometries in comparison to the monomer excited state energies. Energies are calculated with the ADC(2)/aug-cc-pVDZ level of theory [49].

The results of MD simulations of $(dT)_{18}$ strand show that relative amount of the thermally achieved thymine structures possessing ππ* transitions at about 300 nm does not exceed 0.2 percent. Such a small amount of the distorted stacking structures in

$(dT)_{18}$, predicted by MD simulations, agrees with the fact that the apparent quantum yield of CPD formation in $(dT)_{20}$ was found to be practically constant within 20% experimental error in a wide spectral range up to 310 nm [99]. This means that the action spectrum in that case practically coincides with the DNA absorption spectrum, thus implying a very insignificant amount of the stacking structures absorbing at 300 nm. This is in contrast with the results obtained in some cases for natural genomic DNA, the CPD action spectrum of which differed from the absorption in the 300 nm region, thus indicating more amount of the structures absorbing at 300 nm. The next question we addressed in our study was what structures in natural NAs could favor the distorted dimers with reduced inter-base distance. In the $(dT)_{18}$ case, our MD simulations predict that the distorted dimers can be formed at the terminal sites and also in curved and hairpin regions of the thymine chain.

In PDB database we found several examples of noncanonical structures containing neighboring thymines exhibiting red-shifted ππ* transitions. Thymine dimers with $d \lesssim 3.3$ Å and $\eta \lesssim 50°$ (blue dots in Fig. 3.2.1) found in i-motif 1BAE [202] (Fig. 3.2.6), dsDNAs containing thymine-thymine mismatch (2LL9 [203], Fig. 3.2.7) and abasic site (1FZS [204], Fig. 3.2.8) revealed low-lying ππ* states red-shifted by 0.4-0.5 eV from the B-form maximum.

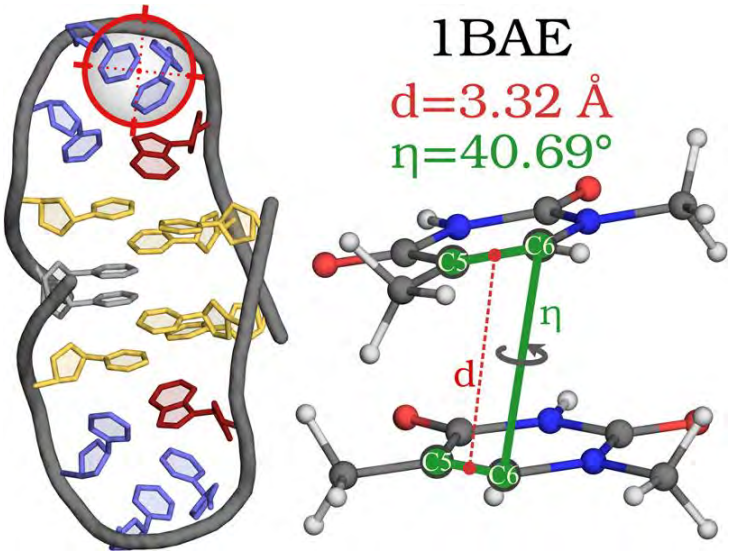


Fig. 3.2.6. Structure of thymine dimer in i-motif (PDB ID: 1BAE) [49].

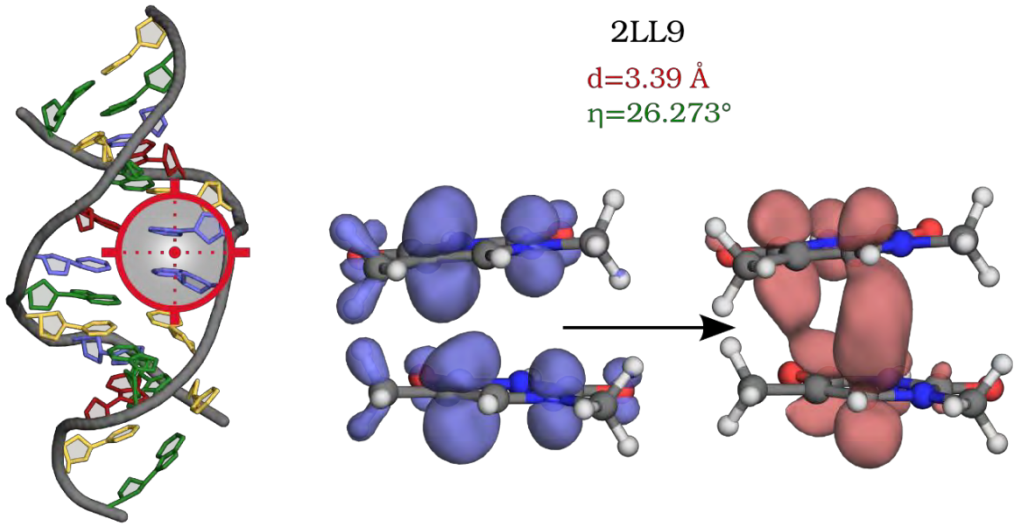


Fig. 3.2.7. Structure and attachment/detachment electron densities for the lowest-energy $\pi\pi^*$ transition of thymine dimer from dsDNA containing thymine-thymine mismatch (PDB ID: 2LL9) [49].

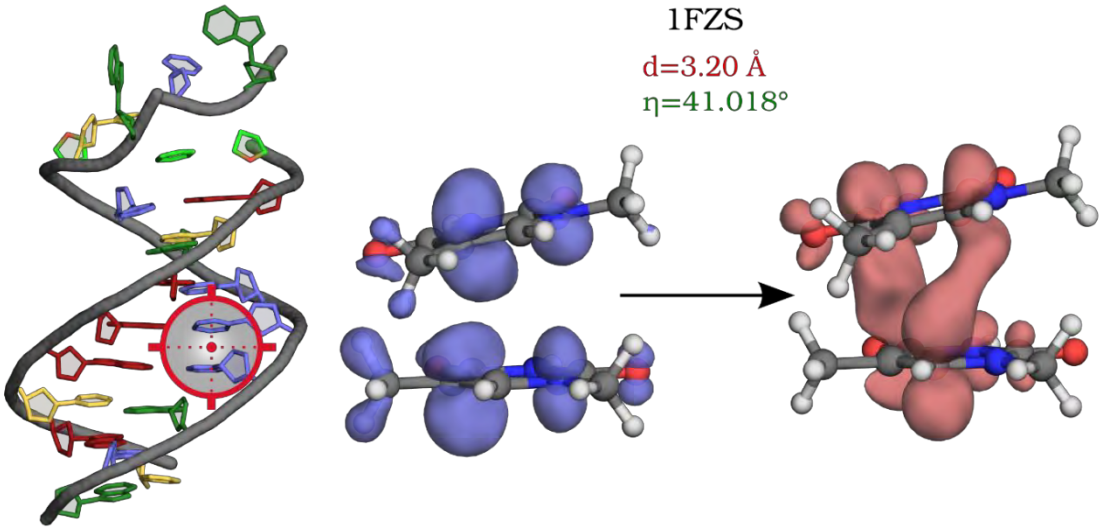


Fig. 3.2.8. Structure and attachment/detachment electron densities for the lowest-energy $\pi\pi^*$ transition of thymine dimer from dsDNA containing abasic site (PDB ID: 1FZS) [49].

3.3. Excitation spectra of adenine and cytosine dimers in noncanonical conformations.

Thymine is not the only potential target for solar radiation. Cytosine, although to a lesser extent, can also undergo dimerization. The less photoreactivity for cytosine compared with thymine was explained by the existence of stable excimer-like states below (S1/S0) CI [205]. Though CPDs and also pyrimidine (6-4) pyrimidone adducts [14] (with a 10-fold lower yield) are the most frequent lesions in DNA, direct absorption of terrestrial solar radiation in UVB range can also lead to other photoproducts and photochemical reactions in DNA and RNA. For example, adenine can undergo dimerization [206]. UV-induced formation of 8-hydroxy-deoxyguanosine in DNA (but not in guanine) was also observed [207]. It has recently been shown that stacking and base pairing can lead to photoinduced electron and proton transfer [208, 209]. Possible photochemical events in DNA are thus not limited to pyrimidine bases. In this respect, it is interesting to examine the spectra of other nucleobase dimers. Below, we studied cytosine and adenine dimers, which are also able to form photoproducts upon direct UV absorption in both DNA and RNA structures.

The observed red-shifted transitions in the distorted base-stacking conformations are not a unique feature of thymine staked bases in DNA. We also show that other bases in non-canonical DNA/RNA structures can exhibit similar effect as well. Red and yellow dots in Fig. 3.2.1 indicate adenine and cytosine dimers, respectively, in DNA/RNA structures derived from PDB database and possess the geometry that falls within the range of d and η determined above.

Fig. 3.3.1 (left) shows hairpin DNA aptamer 1OLD [210] containing adenine dimers with unusual stacking geometry and (right) - ligand-DNA complex 2PIK [211] containing distorted cytosine dimers. The excited states calculated for the dimers are presented in Tables 3.3.1 and 3.3.2 in comparison with the corresponding B-form dimers.

Table 3.3.1. Energies (in eV) for the 6 lowest excited singlet states of adenine monomer and adenine dimers in various stacking geometries obtained using CIS(D) (first row), ADC(2) (second row) and CC2 (third row) with the aug-cc-pVDZ basis, exciton splitting and shift of the lowest ππ* state relative to the B-form dimer [49].

	nπ*	nπ*	ππ*	ππ*	ππ*	ππ*	ΔE	Shift
Monomer		5.52			5.28	5.29		
		4.96			5.01	5.07		
		5.05			5.11	5.11		
1SK5	5.42	5.43	5.13	5.26	5.27	5.29	0.16	
	4.89	4.92	4.83	4.96	5.02	5.05	0.21	
	4.98	5.01	4.92	5.06	5.07	5.09	0.18	
1OLD	5.15	5.22	4.82	5.22	5.25	5.28	0.46	0.47
	4.75	4.81	4.50	4.90	4.93	5.04	0.54	0.55
	4.83	4.89	4.57	4.92	5.09	5.11	0.54	0.53

Table 3.3.2. Energies (in eV) for the 4 lowest excited singlet states of cytosine monomer and cytosine dimers in various stacking geometries obtained using CIS(D) (first row), ADC(2) (second row), CC2 (third row), and the aug-cc-pVDZ basis, exciton splitting and shift of the lowest ππ* state relative to the B-form dimer [49].

	nπ*	nπ*	ππ*	ππ*	ΔE	Shift
monomer		5.10		4.59		
		4.63		4.35		
		4.83		4.53		
1D8G	5.00	5.01	4.52	4.56	0.04	
	4.45	4.51	4.26	4.30	0.04	
	4.68	4.72	4.45	4.49	0.04	
2PIK	4.75	4.96	4.22	4.65	0.43	0.34
	4.38	4.44	3.97	4.29	0.32	0.33
	4.60	4.66	4.14	4.49	0.35	0.35

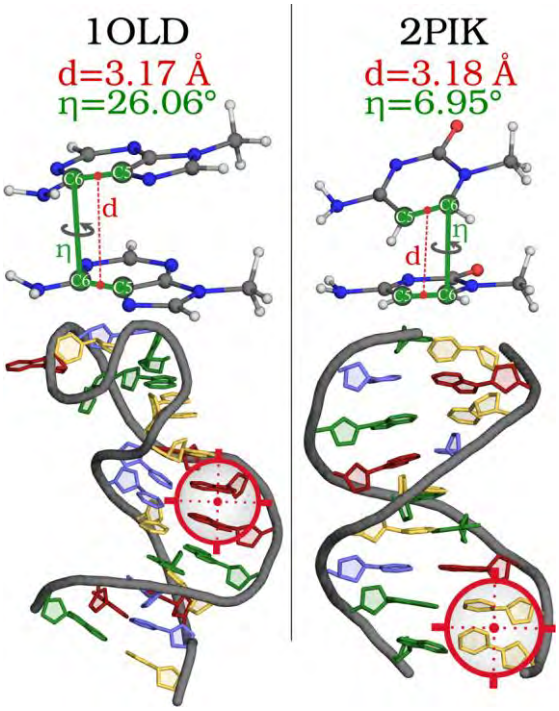


Fig. 3.3.1. Structures of adenine (left) and cytosine (right) dimers in non-canonical structures from PDB database [49].

Like in the case of thymine dimers, the spectra exhibit low-lying excitonic transitions significantly red-shifted by ca. 0.5 eV from the corresponding B-form maxima.

3.4. Structure of the low-lying electronic states.

As already noted above, CT states do not affect the long-wavelength part of DNA absorption spectrum [23-28]. Nethertheless, we addressed the question of whether CT interactions contribute to the low-energy states in the dimers with reduced inter-base distances. To investigate the nature of the red-shifted transitions, we calculated the distributions of the attachment/detachment electron density and performed the structure analysis of the low-lying excited states in the studied structures by means of descriptors proposed in [212]. The lowest-energy ππ* states in all distorted dimers are delocalized on two bases as in the case of B-form dimers, and the transitions are mainly of ππ* excitonic character as can be seen from the density redistribution maps (Fig. 3.4.1).

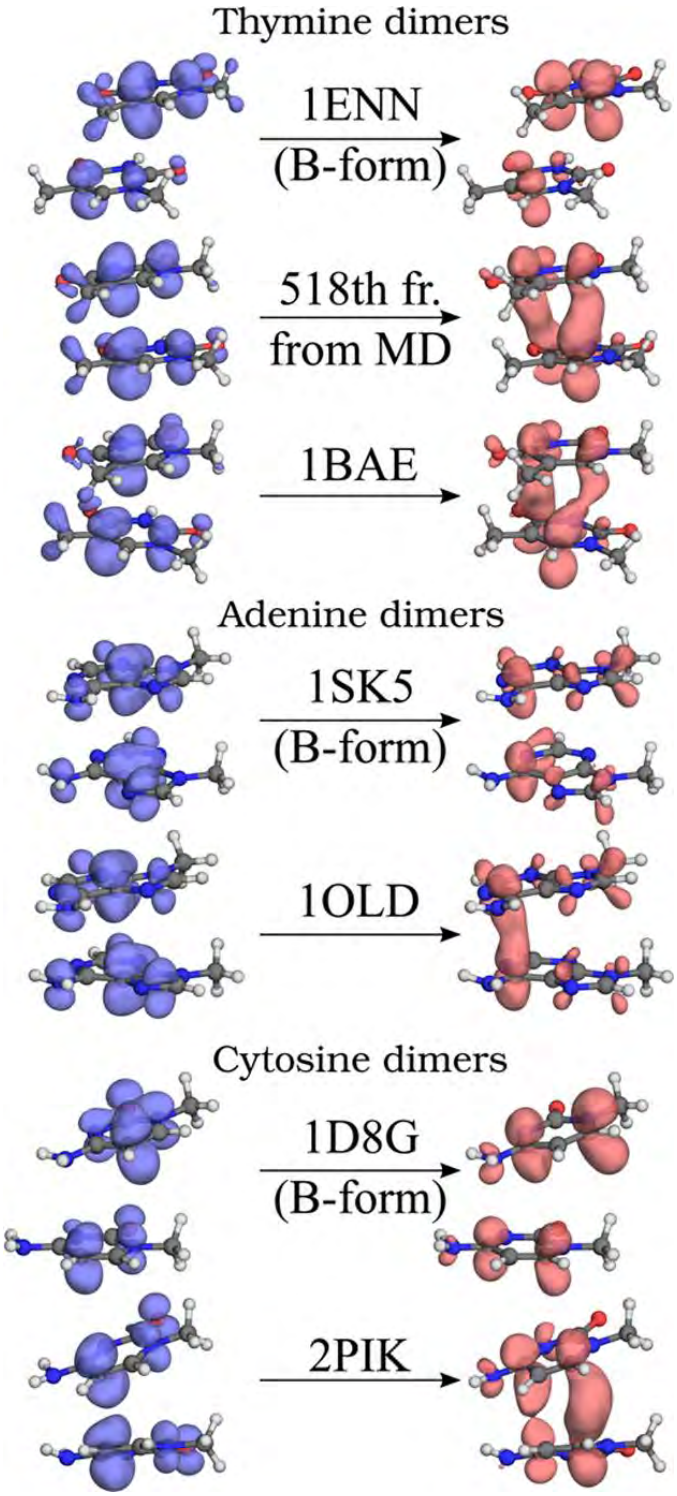


Fig. 3.4.1. Redistribution of electron densities for the lowest ππ* states of thymine, adenine, and cytosine dimers at various geometries [49].

Table 3.4.1. Excitation energies (E, eV), oscillator strength (f), statistical descriptors, and types of transitions in thymine, adenine and cytosine dimers in various geometries. The calculations were performed by the ADC(2)/aug-cc-pVDZ method [49].

Assignment	E(eV)	f	PR	CT	CTnt
TT B-form 1ENN					
nπ *	4.44	0.00	0.99	-0.02	0.04
nπ *	4.45	0.00	0.97	-0.04	-0.05
ππ *	4.68	0.15	1.03	-0.03	-0.06
ππ *	4.81	0.24	0.98	-0.08	0.12
TT 1BAE					
nπ *	4.31	0.00	1.21	0.09	0.02
nπ *	4.33	0.01	1.34	0.20	0.02
ππ *	4.42	0.03	1.98	0.15	-0.01
ππ *	4.78	0.29	1.98	-0.03	0.02
TT 518th frame from MD					
nπ *	4.35	0.01	1.97	0.06	-0.02
nπ *	4.38	0.01	1.63	0.02	0.10
ππ *	4.32	0.01	1.79	0.11	-0.02
ππ *	4.80	0.31	1.98	-0.04	0.03
AA B-form 1SK5					
nπ *	4.89	0.02	1.53	0.05	0.03
nπ *	4.92	0.02	1.90	0.13	0.01
ππ *	4.83	0.04	1.92	0.09	0.04
ππ *	4.96	0.22	1.98	0.12	-0.04
ππ *	5.02	0.01	1.82	0.18	0.10
ππ *	5.05	0.11	1.67	0.29	0.00
AA 1OLD					

nπ *	4.75	0.02	1.90	0.36	-0.17
nπ *	4.81	0.01	1.23	0.20	0.05
ππ *	4.50	0.02	1.95	0.42	-0.16
ππ *	4.90	0.15	1.87	0.40	-0.24
ππ *	4.93	0.02	1.94	0.42	-0.17
ππ *	5.04	0.17	1.97	0.13	0.13
CC B-form 1D8G					
nπ *	4.45	0.00	1.06	0.05	0.05
nπ *	4.51	0.00	1.10	0.08	-0.06
ππ *	4.26	0.04	1.25	0.00	0.00
ππ *	4.30	0.09	1.24	0.01	0.02
CC 2PIK					
nπ *	4.38	0.00	1.03	0.03	0.02
nπ *	4.44	0.00	0.98	-0.02	0.03
ππ *	3.97	0.00	1.98	0.18	-0.09
ππ *	4.29	0.11	1.96	-0.05	-0.01

The values of participation ratio (PR), i.e., the number of coherently coupled chromophores close to 2, confirm this conclusion (Table 3.4.1). A possible contribution of charge or charge-resonance terms is indicated by a small overlap of densities in the case of the distorted dimers. A detailed description of the structure of the excited states really shows that charge-transfer interactions make an insignificant contribution to the lowest ππ* states (Table 3.4.1). It is seen by increasing the CT values to about 0.1-0.2 for the thymine and cytosine structures and up to 0.4 for the 1OLD adenine dimer. Though, for the thymine and cytosine dimers, net charge shift (CTnt) remains insignificant, which indicates of charge resonance, and not the charge transfer. For the 1OLD adenine dimer, the values of CT and CTnt indicate that both the charge resonance and charge transfer partially contribute to the lowest ππ* state. The noticeable red shift

of the low-energy transitions in the distorted base-stacking conformations relative to the B-form of DNA is apparently caused by an increase in excitonic coupling due to a decrease in the inter-base distance, as evidenced by the above analysis. The contribution of the CT and charge-resonance interactions can be affected by the environment and interactions in the case of the distorted dimers. The state character can also be affected by with neighboring bases [28]. As these probable effects can influence on the spectra of non-canonical conformations of the dimers, they should be further studied in future.

3.5. Effictivity of interaction with solar radiation for the stacked dimers in noncanonical structural forms and the hot spots for the formation of photodimers in DNA.

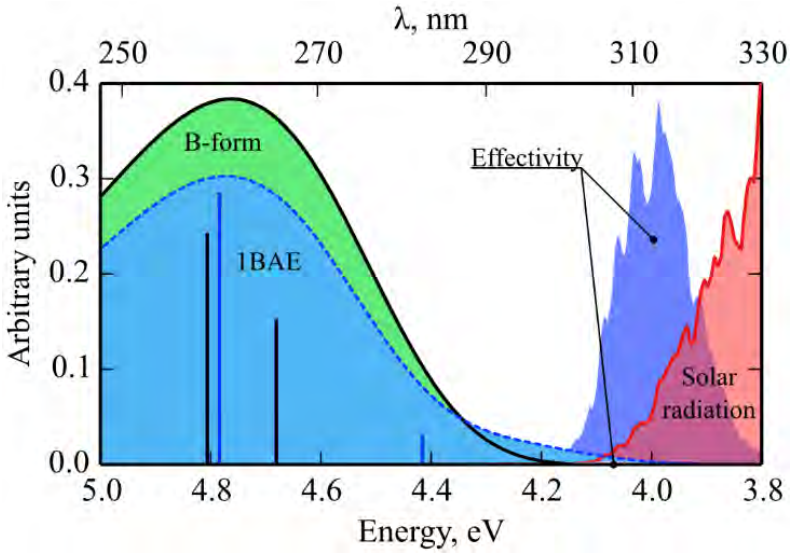


Fig. 3.5.1. Absorption spectra of the thymine dimers in B-form (PDB ID: 1ENN) and non-canonical stacking (PDB ID: 1BAE) geometries obtained at the ADC(2)/aug-cc-pVDZ level and convoluted with the monomer absorption spectrum to account for vibronic structure of the transitions (vertical sticks indicate positions of ππ* states), effectivity spectra obtained as the products of the absorption spectra and the spectrum of solar radiation [49].

The vibronic structure of the spectra (causing significant broadening [28]) was modeled by convolution of the spectra obtained by ADC/aug-cc-pVDZ method with experimental absorption spectrum of thymine, to compare the integral absorption rate of terrestrial solar radiation for the bases located in various stacking geometries. Fig. 3.5.1 illustrates a typical spectrum of the distorted thymine dimer (1BAE) in comparison to the B-form dimer. Qualitatively, the difference between absorption spectra of the B-form and the distorted dimer is analogous to the difference observed between the CPD action spectrum and poly(dT) absorption spectrum given in Fig. 3.5.1. Compared with the canonical dimer, the long-wavelength tail is clearly visible in the absorption spectrum of the distorted dimer. A noticeable increase in the relative number of photons absorbed by the distorted thymine dimers and, consequently, their relatively high sensitivity to radiation, is provided by the increasing intensity of solar radiation in this spectral range. Quantitatively, this is clearly seen from a comparison of the effectivity spectra obtained for the B-form and distorted dimers by multiplying the corresponding absorption spectra and the solar radiation spectrum (Fig. 3.5.1). In the case of the distorted dimer, the integral effectivity, i.e., the absorption rate, is approximately two orders of magnitude higher than that of the B-form dimer. Surely, a more detailed description of vibronic transitions and environmental effects can change the efficiency ratio. Although, it can be assumed that qualitatively the difference between B-form dimer and the dimer with a reduced inter-base distance will remain unchanged.

Absorption rate that dramatically increases in the distorted dimers is not the only factor affecting the sensitivity of DNA structures to solar radiation. Rate of photochemical reaction is a product of both absorption rate and quantum yield. Both experimental [90, 213] and theoretical [93, 214, 215] studies suggest that the efficiency (quantum yield) of CPD formation is strongly conformationally dependent, while solvent has no effect on the photoreactivity. The photodimerization proceeds via a singlet excited state in a configuration near the conical intersection (S0/S1-CI) geometry. Insignificant yield of CPD formation in DNA from triplet state is probably also possible, since it takes place in thymine solution [216]. The triplet mechanism likely becomes important in UVA range where sensitized photoreactions via triplet-

triplet energy transfer are probably dominant. The conformational range for thymine dimerization is not quite understood. Theoretical QM studies predict that CI can be reached at d<3.6-4 Å [93], which is close to the empirical estimations of MD simulation [91, 200]. MD simulations also predict the cut-off for dihedral angle to be 30-50°. However, QM calculations indicate that the dimer formation can proceed at substantially higher values. Since the observed dimer conformations with significantly red-shifted transitions evidently appear to be within the predicted range for the dimerizable dimers, it seems reasonable to assume that the quantum yield in the dimers with unusual stacking geometry with d≲3.3 Å and η≲50° can be at least not less than that for the major fraction of dimerizable dimers having the absorption spectrum close to the B-form spectrum. In this case, the obtained above effectivity spectra reflect indeed much higher sensitivity to solar radiation for the distorted stacking dimers found in some non-canonical DNA structures.

Many experimental studies reveled that UV-induced DNA lesions were not randomly distributed in DNA. It has been shown that formation of the photoproducts is strongly sequence and conformation dependent [18, 100-107]. Most studies on the conformation and sequence effects dealt with UVC irradiation. However, the results on UVC-induced lesions in some cases differ from that upon UVB and SSL irradiation [102-104]. Our data provide one more insight on the origin of the observed effects and potential hot spots of photoproduct formation in NAs. As it follows from our calculations, the stacked bases with reduced inter-base distances within the conformational range of d≲3.3 Å and η≲50° appear to be much more sensitive to the terrestrial solar radiation due to significant value of exciton splitting and, consequently, low-lying ππ*states in those structures in comparison with B-form stacked bases. Such stacking geometries are obviously the preferred targets for terrestrial solar radiation. In UVC range, where spectral difference between stacking conformations is not essential, the photochemical selectivity of the distorted stacked dimers can be caused by their low-lying excited states serving as a trap for excitation energy transfer from neighboring bases. The effect of energy trapping can also be important in the UVB range as well, especially in the case when oscillator strength of the lowest state appears to be low enough.

Rare base-stacking forms with significant absorption in the region of 290-300 nm due to large exciton splitting were observed in our earliest experimental studies [65, 95, 96]. Like in the case of the most dimerizable thymine dimers absorbing in the long-wavelength spectral range, as can be seen from the action spectrum in Fig. 3.5.1, minor forms of stacked bases with significant absorption above 290 nm were seen in the fluorescence excitation spectra of polymeric forms of DNA due to their relatively high quantum yield compared to the major fraction of the bases. The comparison of the efficiency spectra for canonical and distorted dimers (Fig. 3.5.1) predict that such distorted stacking conformations would become biologically significant at concentrations above ~1% relative to the total amount of the bases that can undergo a given photochemical damage with the same quantum efficiency. For example, in the case of thymine oligonucleotide, the concentration of all dimerizable thymines is about 5%. The estimated above number of conformations with the red-shifted transitions is ca. 0.2%. Such amount is enough so that with an increase by a factor of 100 in absorption 80% of CPDs are formed by thymines being in the distorted conformations.

Concentration of the stacked bases with such distorted stacking geometry in DNA is evidently determined by their secondary structure. Revealing the structures in which such distorted stacked dimers can be realized is of great importance for determining the hot spots of CPD and other photoproduct formation. Our observations show that the dimers with reduced inter-base distances are most frequently observed in the curved and hairpin-like NA structures. This is in line with some experimental findings that photoproduct formation is increased at the site of the kink in DNA [100]. DNA unwinding during replication provides a certain flexibility of the bases, allowing them to form stacking structures with reduced inter-base distances. However, significant local conformational deviations can also occur even in double-stranded B form of DNA, which result from so-called sequence effects, as it takes place in the case of 1ZF0 structure [49] that exhibits an adenine dimer with significantly red-shifted $\pi\pi^*$ state [49]. In other structures studied in our work, where the inter-base distance appeared to be less than 3.3 A, the native B form was violated by the interaction with ligands (2PIK) or mismatches (2LL9, 1FZS). In this respect, it can be noticed that experimental results

showed that hot spots for UV-induced pyrimidine dimer formation in vivo were concentrated in transcription factor binding sites [101] where native B form may be distorted by interaction with proteins. It should be also noted that some of the dimers with red-shifted ππ* states were observed at terminal sites of the strands. In the case of cellular DNA, terminal sites can be formed due to strand breaks, which can occur through various DNA-damage and other processes in living cells.

It was shown earlier that the sequence-specific distribution of DNA photoproducts was wavelength-dependent [102-104]. In some cases, it was explained by red shift of methyl-cytosine absorption spectrum compared to thymine [104, 105]. The red-shifted transitions in the distorted stacked structures observed in our study can be one more factor contributing to the difference between the mutational spectra of UVB and UVC radiation. All those distorted stacking structures, as it follows from their electronic spectra, are the most sensitive to terrestrial solar radiation. Detailed structural analysis and calculations of the spectra along with photochemical studies can be helpful in revealing the potential hot spots in NAs. It is also worth noting that the distribution of the photoproducts in NAs caused by native terrestrial solar radiation with significant intensity at 300 nm m be quite different from the distributions that used to be obtained with UVC radiation at 254 nm for the reasons stated above.

3.6. Absorption spectra of i-motif DNA.

In Section 3.5, the red-shifted transitions in some non-canonical stacking forms were predicted using the QM calculations. It has also been shown that the excitonic term is dominant in the lowest-energy electronic states of the base stacking forms. Normally, these transitions are not visible in the absorption spectra of nucleic acids, but in some cases can be observed in the fluorescence excitation spectra [65, 96], i-motif, in this regard, appears to be a unique DNA structure with the strong red shift of the low-lying electronic excited state, which is seen in the absorption spectrum (Fig. 3.6.1a).

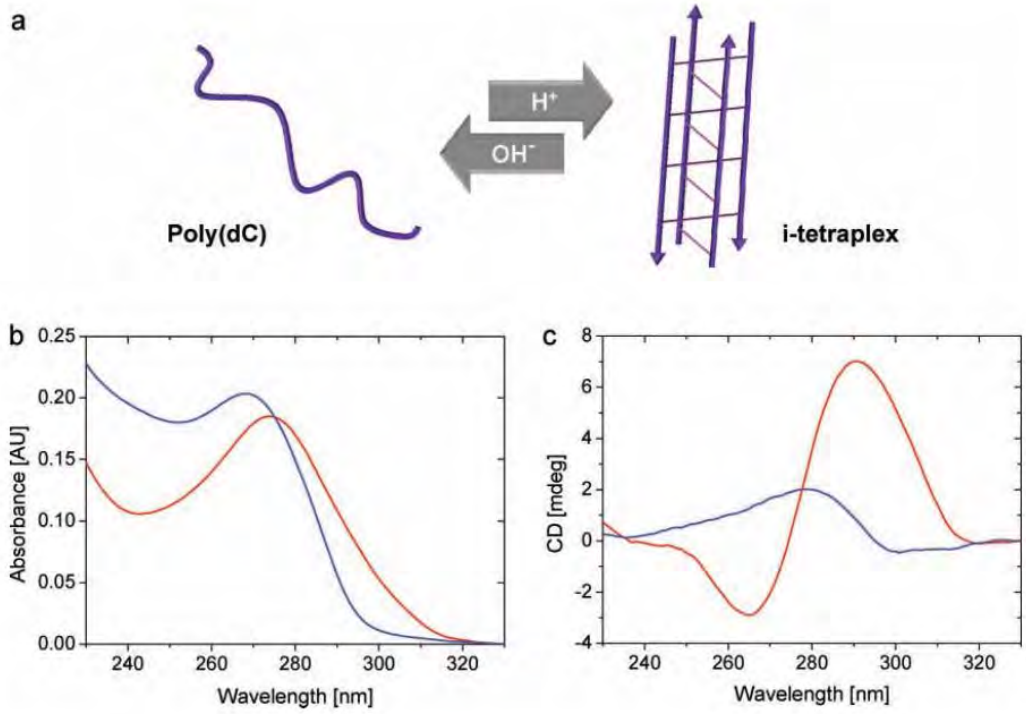


Fig. 3.6.1. a) Schematic representation of the polycytosine chain of poly-(dC) at high and low pH. At high pH, the polynucleotide is in a single-stranded conformation; at weak acid pH, i-motif is formed, consisting of two intercalated poly- (dC) duplexes; b) absorption spectrum; c) CD spectra of poly- (dC) in 0.1 M NaOH (blue) and in Tris acetate at pH 4.5 (red) [218].

i-motif is a non-canonical form of DNA that occurs in the cytosine regions of DNA, usually at low pH, also called C-tetraplex [217]. Cytosine chains form a structure consisted of two parallel chains of semi-protonated cytosine duplexes, which form C – C^+ pairs and are intercalated into each other. The geometry of the i-motif structure significantly differs from double-stranded A and B forms of DNA. It is shown schematically in Fig. 3.6.1a [218]. In vitro experiments show that cytosine-rich tracts of genomic DNA can form i-motif at pH close to neutral [218-221]. The absorption spectrum of the i-motif and its CD spectrum are significantly different from the B-form of DNA (Fig. 3.6.1b).

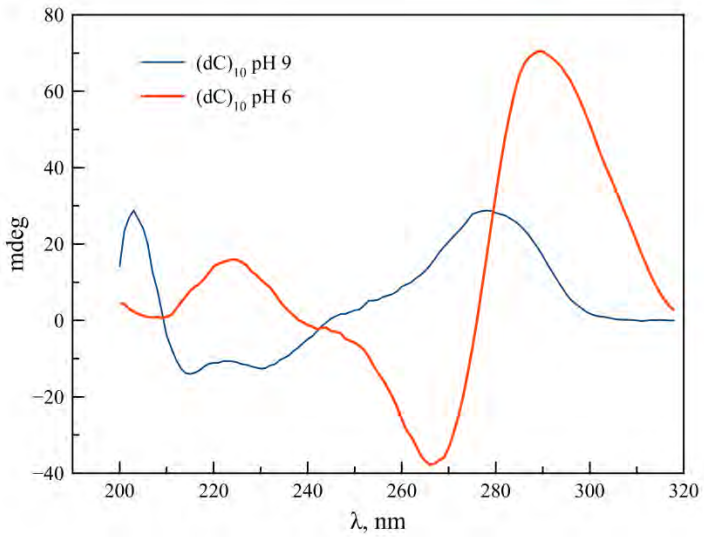


Fig. 3.6.2. CD spectra of $(dC)_{10}$ at pH 6 and 9 [58].

We investigated the formation of i-motif in the C10 oligonucleotide [58]. As can be seen from the CD spectrum (Fig. 3.6.2), which is characteristic for semi-protonated cytosine chains [218-221], $(dC)_{10}$ in water (pH 6) is in a semi-protonated conformation with the C^{+}-H···C pair. It leads to formation of the so-called i-motif (i-$(dC)_{10}$). $(dC)_{10}$ at pH 9 is in a neutral single-stranded conformation, ss-$(dC)_{10}$, Fig. 3.6.2. The pKa value for the oligonucleotide is increased to 7 in comparison to the pKa 4.2 monomer [218]. The UV titration of $(dC)_{10}$ gives the same pKa value equal to 7 (Fig. 3.6.3).

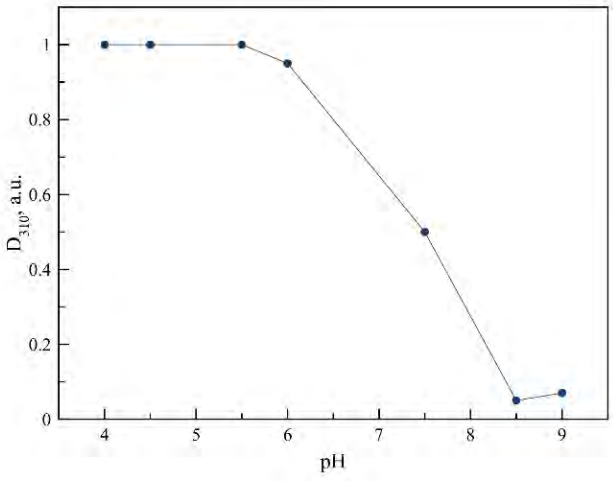


Fig. 3.6.3. UV titration curve for $(dC)_{10}$, λ=310 nm [58].

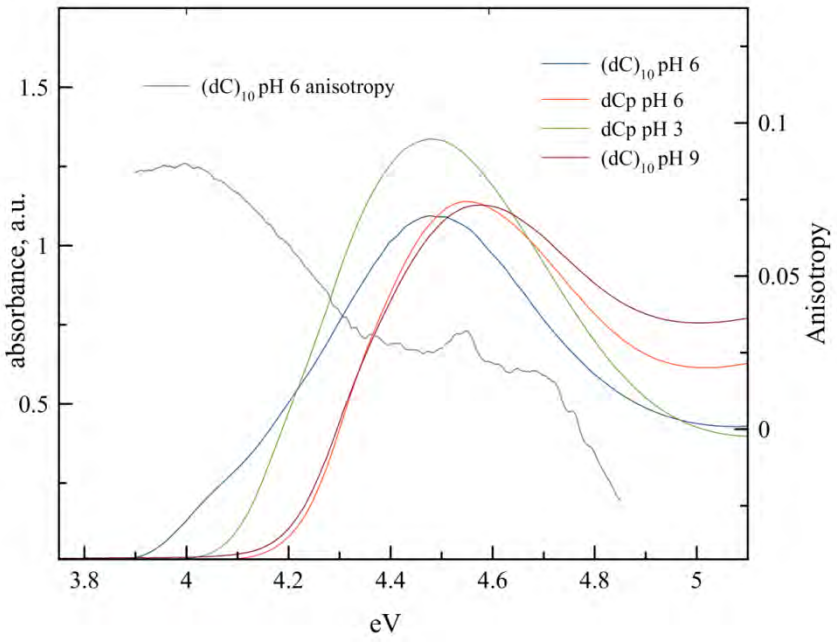


Fig. 3.6.4. Absorption and fluorescence excitation anisotropy (λ_{em} = 400 nm) spectra of dCp and $(dC)_{10}$ at different pH conditions [58].

The absorption spectra of dCp and two forms of $(dC)_{10}$ are presented in Fig. 3.6.4. While the absorption spectrum of the single-stranded conformation of $(dC)_{10}$ is very close to the spectrum of monomer dCp at neutral pH, the absorption spectrum of the hemi-protonated i-motif structure differs from both the neutral and protonated (pH 3) dCp spectra. The spectrum also exhibits a shoulder around 4 eV, indicating a low-energy electronic transition. A complex structure of the overall absorption band is also revealed by the fluorescence excitation anisotropy curve, indicating the presence of at least two electronic transitions within the UV band. As compared with ss-$(dC)_{10}$, such behavior of the i-$(dC)_{10}$ absorption spectrum is evidently the manifestation of strong exciton interactions. The conservative CD spectrum of i-$(dC)_{10}$ is also a consequence of the exciton interaction. The exciton splitting in the absorption spectrum of the i-motif structure can approximately be estimated as ca. 0.4 eV (the difference between the positions of the maximum and the shoulder in the spectrum), which is several times greater than the typical values in DNA [27, 94]. In principle, exciton as well as charge-resonance and charge-transfer terms can contribute to the low-energy electronic

transition at the long-wavelength tail of the spectrum. A detailed description of the structure of the excited states in $(dC)_{10}$ requires advanced QM calculations.

We have calculated the absorption spectrum of the semi-protonated tetramer derived from the crystal i-motif 1ELN structure taken from the PDB database [222] (Fig. 3.6.5).

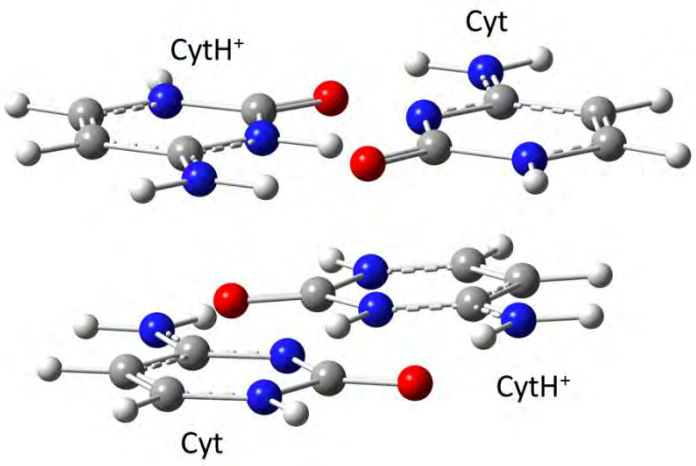
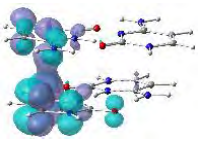
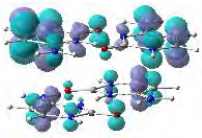
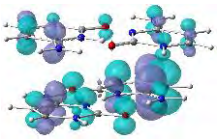
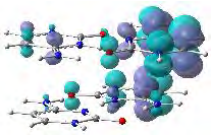
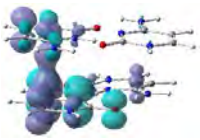
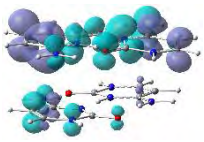


Fig. 3.6.5. Structure of the i-motif tetramer [58].

The geometry of the semi-protonated cytosine tetramer ($Cyt_4 2H^+$, shown in Fig. 3.6.5) was constructed by first optimizing the monomers and then inserting them into an arrangement of the initial tetramer geometry in i-motif (PDB: 1ELN). The stick spectra of the protonated and neutral monomers and semi-protonated i-motif species are shown in Fig. 3.6.6 and Table 3.6.1. The calculated spectra of the i-motif and neutral and protonated monomers qualitatively replicate the relative positions of the maxima and intensities in the experimental absorption spectra shown in Fig. 3.6.4. In general, the calculated maxima are blue-shifted by 0.1 eV relative to the experimental maxima. Using an explicit solvent, it is obviously possible to achieve a better quantitative agreement with the experimental spectra.

Table 3.6.1. Energies of vertical excitations (eV) with oscillator strengths (in brackets) of neutral (Cyt) and protonated ($CytH^+$) cytosine, as well as the semi-protonated i-motif tetramer ($Cyt_4 2H^+$) taking into account the solvent in the COSMO model. Charge difference densities (CDD) for electronic transitions, where dark and light colors denote a hole and an electron, respectively [58].

state (type)	CDD \ System	$Cyt_4 2H^+$	Cyt	$CytH^+$
S_1 ($\pi\pi^*$)		4.27 (0.012)		
S_2 ($\pi\pi^*$)		4.48 (0.008)		
S_3 ($\pi\pi^*$)		4.56 (0.422)		4.59 (0.265)
S_4 ($\pi\pi^*$)		4.64 (0.051)	4.75 (0.126)	
S_5 ($\pi\pi^*$)		4.93 (0.239)	5.40(0.224)	
S_6 ($\pi\pi^*$)		5.09 (0.051)		
S_7 ($\pi\pi^*$)		5.19 (0.007)		
S_8 ($\pi\pi^*$)		5.24 (0.007)		
S_9 ($\pi\pi^*$)		5.32 (0.010)		

S_{10} (nπ*)		5.37 (0.013)		
S_{11} (nπ*)		5.42 (0.026)		
S_{12} (ππ*)		5.44 (0.015)		
ππ*				5.95 (0.120)
nπ*			5.51 (0.003)	6.10 (0.000)

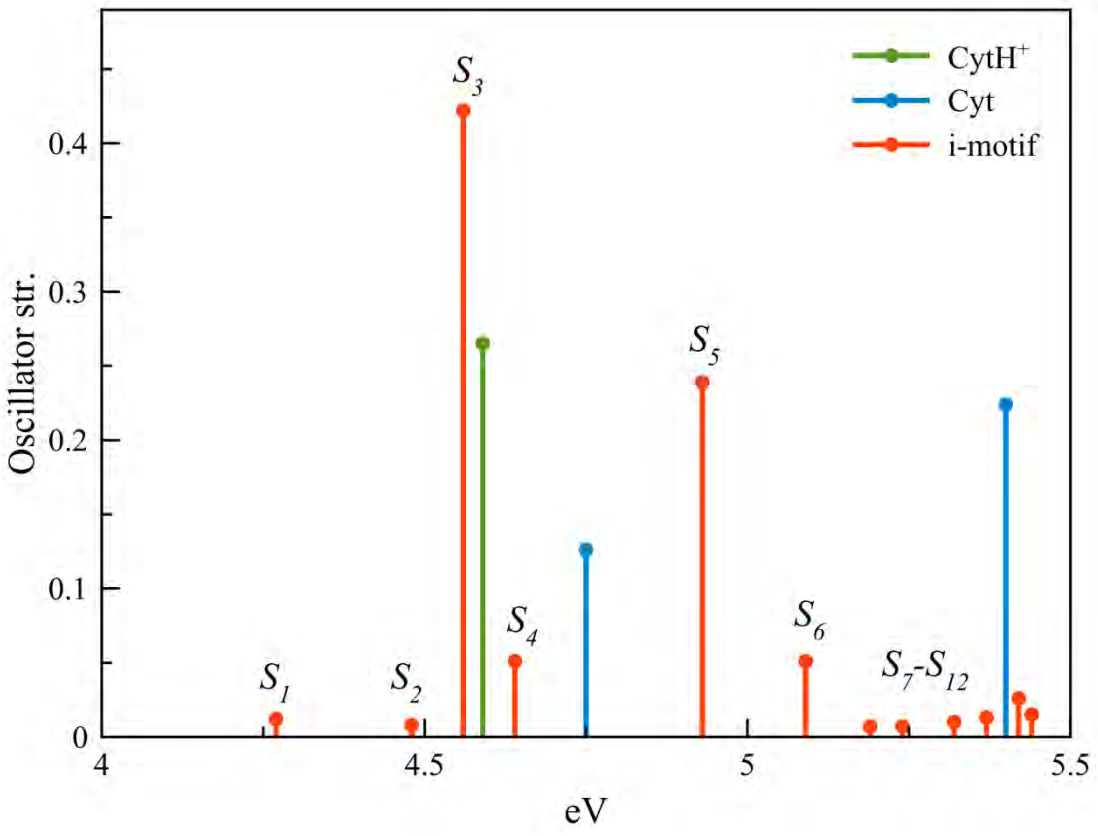


Fig. 3.6.6. Calculated stick spectra of the protonated and neutral cytosine monomers and the cytosine tetramer derived from the PDB-based i-motif structure [58].

The protonated and neutral monomers have the low S_1 ππ* transitions at 4.59 and 4.75 eV, respectively, which are split into ππ* states in the tetramer. The charge difference

densities (CDD [223]) presented in Table 3.6.1 demonstarte that these states are delocalized by two-to-four monomers units and are of excitonic nature with some admixture of charge transfer (CT) or charge resonance (CR) states. Additional calculations are required for a more detailed analysis. Importantly, the lowest ππ* transition in the i-motif is red-shifted by approximately 0.3 eV from the maximum due to a significant exciton interaction. Typical values of the exciton splitting in the B-form of DNA, in contrast, are less than 0.1 eV [27, 94]. The high value of this shift calculated for the i-motif is consistent with what is observed in the experimental absorption spectrum of i-$(dC)_{10}$. The latter shows the distinct low-energy transition(s) at about 4.1 eV (Fig. 3.6.4).

3.7. Conclusions to Chapter 3.

The stacking structures of nucleobases with a geometry determined by the distance between the midpoints of C5-C6 ≲3.3Å bonds and the dihedral angle C5-C6-C6-C5 ≲50 ° exhibit low-lying exciton states in the region of 300 nm of the DNA excitation spectrum. These structures are the most effective centers (hot spots) interacting with terrestrial solar radiation, the intensity of which increases sharply in the region of wavelengths > 300 nm. Conformational analysis shows that the data on the stacking structure are most likely to be realized in some noncanonical forms of DNA and RNA. The noncanonical structure of the i-motif also has a low-energy transition of an excitonic nature in the region of about 300 nm, observed in experimental spectra.

CHAPTER 4. DYNAMICS OF ELECTRONICALLY EXCITED STATES IN VARIOUS DNA STRUCTURES

As was noted in Chapter 1, the primary and subsequent photochemical reactions following UV excitation can occur very fast. For example, cyclobutane pyrimidine dimers (CPD) are known to form within ~1 ps following UV excitation [90, 213], implying no rearrangement of the stacked bases. Answers to questions from which excited states do the photochemical reactions start and what is the nature of the photochemical reaction pathways are of vital importance in the understanding of the fundamental principles of DNA photochemistry. These primary photoprocesses occur on a femtosecond time scale and greatly affect the subsequent photochemistry. They have been of intense research interest during the past decade [13, 224, 225]. In addition, excited-state properties of DNA are of interest to exploit charge transport through DNA with the relevance to both cellular processes and DNA-based devices [226, 227].

4.1. Steady-state luminescence and luminescence kinetics of various forms of cytosine DNA chains.

In the previous Chapter, we examined how the absorption in the oligonucleotide $(dC)_{10}$ changes depending on the conformation of the DNA. In this Chapter, we study the excited state dynamics in cytosine DNA tracts using the ultrafast fluorescence up-conversion technique. Specifically, we studied the excited-state dynamics for both neutral and hemi-protonated cytosine chains $(dC)_{10}$. The latter is assembled into the so-called i-motif structure. The i-motif structure is of interest for biology [228], as well as for nanotechnology applications [229]. It is also known that direct excitation of cytosines leads to formation of mutagenic photoproducts that are not efficiently repaired in cells [230, 231], therefore, the study of stacked cytosines is important for establishing the correlation between the initial conformation, the nature of excited state and photodamage. We found that the hemi-protonated i-motif structure of $(dC)_{10}$ exhibits two spectrally different components due to the local (monomer-like) and delocalized

(exciton) emissive states both formed from the Franck-Condon excited state in less than 100 fs [58].

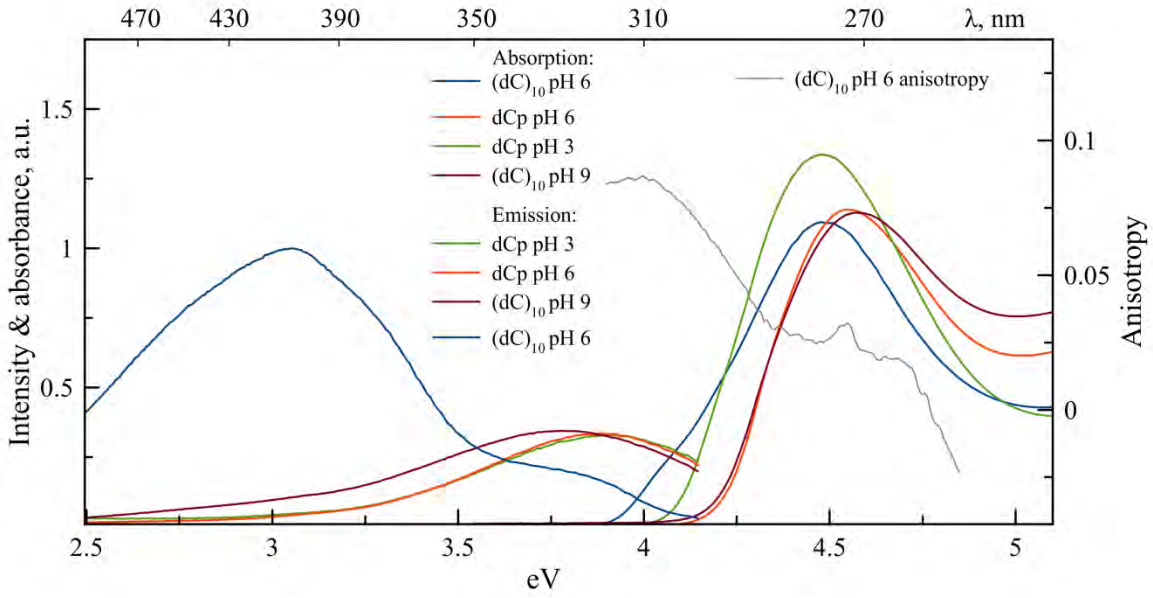


Fig. 4.1.1. Absorption, fluorescence (λ_{ex} = 260 nm), and fluorescence excitation anisotropy (λ_{em} = 400 nm) spectra of dCp and $(dC)_{10}$ [58].

The steady-state fluorescence spectrum of i-$(dC)_{10}$, in comparison with the monomeric forms and ss-$(dC)_{10}$, shows a wide long-wavelength emission band of about 400 nm, in addition to the monomeric emission band of 330 nm (Fig. 4.1.1).

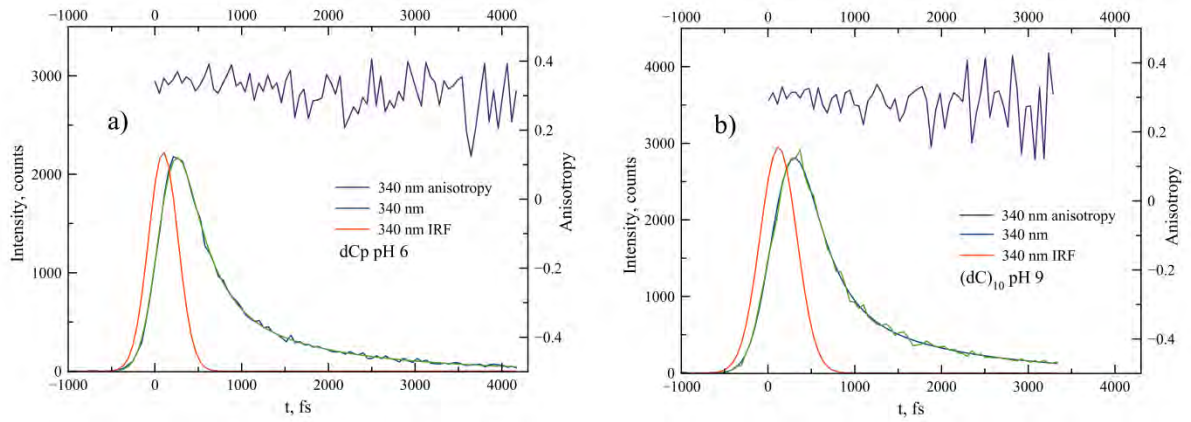


Fig. 4.1.2. Luminescence intensity and luminescence anisotropy decay curves of dCp in water (pH 6) (a) and $(dC)_{10}$ at pH 9 (b) [58].

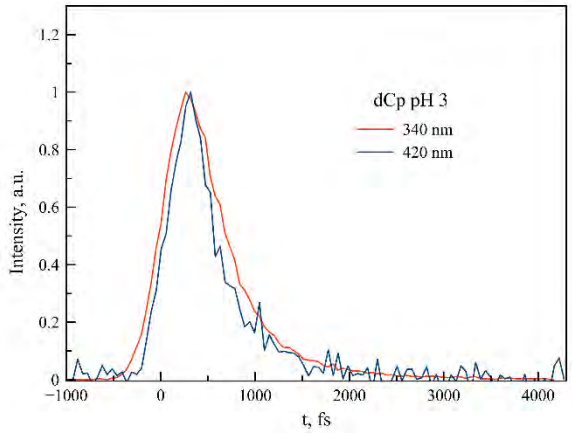


Fig. 4.1.3. Luminescence decay curves of dCp at pH 3 [58].

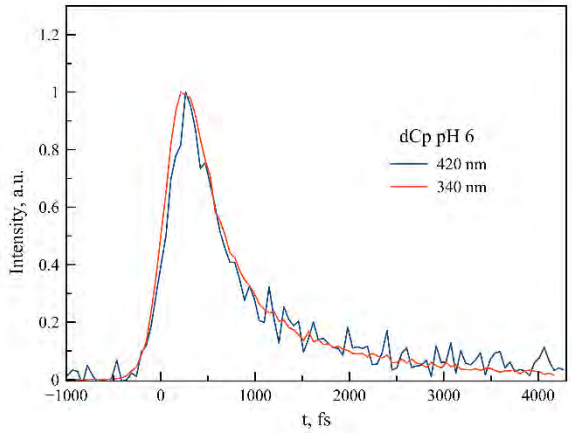


Fig. 4.1.4. Luminescence decay curves of dCp at pH 6 at 340 and 420 nm [58].

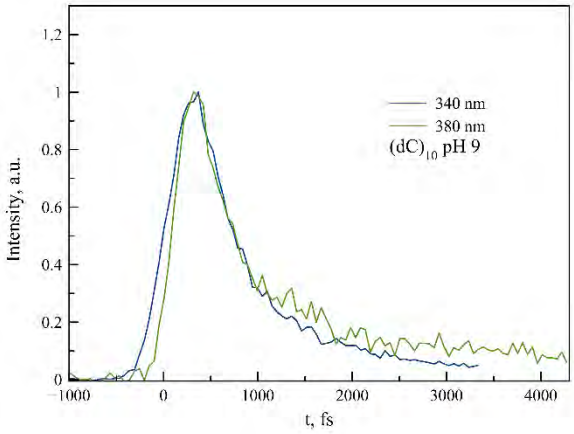


Fig. 4.1.5. Luminescence decay curves of $(dC)_{10}$ at pH 9 at 340 and 380 nm [58].

The luminescence decays of the monomer and two forms of DNA were studied in detail on a femtosecond time scale. The fluorescence and anisotropy decay curves of dCp at neutral and acid pH, ss-$(dC)_{10}$ at pH 9 and semi-protonated i-$(dC)_{10}$ at pH 6 (Fig.

4.1.2-4.1.7), recorded at 340 nm are almost identical. The approximation results are given in Table 4.1.1. It means that the nature of the short-wavelength band at 330 nm in the polymer and monomer spectra is the same. Therefore, in the case of a polymer, this emission can be considered as “monomeric” fluorescence from a locally excited state. Though, the amplitude of the i-$(dC)_{10}$ decay curve turns out to be 2 times less than for the monomer (Fig. 4.1.6). This points to that the yield of “monomeric” fluorescence in i-$(dC)_{10}$ is about 50%. Since the integral absorption of the semi-protonated $(dC)_{10}$ is only 5% less than the average absorption of the protonated and neutral monomer (Fig. 4.1.1), this cannot be regarded as a hypochromic effect.

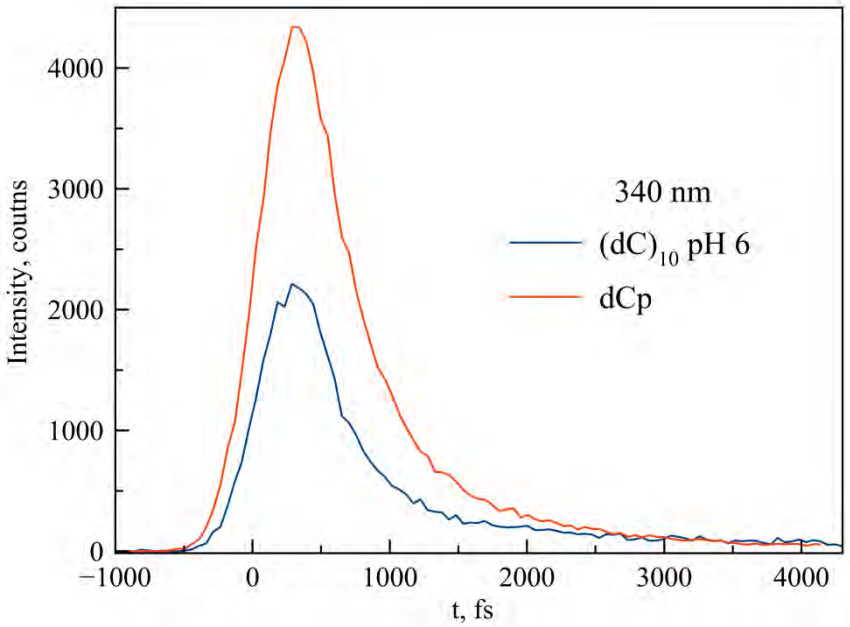


Fig. 4.1.6. Luminescence decay curves of $(dC)_{10}$ in water and hemi-protonated dCp at pH 6 (average curve of the neutral and protonated forms). Signals of the samples with equal absorbance at 266 nm were recorded in back-to-back measurements [58].

Table 4.1.1. Decay components of $(dC)_{10}$ and dCp. The data were fitted with a bi-exponential function $a_1 exp(-t/t_1)+(1-a_1)exp(-t/t_2)$. In the case of global fitting on a longer time scale, the data were approximated with a three-exponential function [58].

Sample	a_1	t_1, fs	t_2, fs	t_3, fs
dCp at 340 nm, pH 6	0.79±0.03	310 ± 30	1400 ± 100	-
dCp at 340 nm, pH 3	0.83±0.07	310 ± 30	800 ± 100	-
$(dC)_{10}$ at 340 nm, pH 9	0.80±0.03	300 ± 30	1400 ± 200	-
$(dC)_{10}$, pH 6 (Global fit)		310 ± 30	2000 ± 200	25000 ± 5000

It should also be noted that the part of the fluorescence at a wavelength of 340 nm may refer to the single-stranded form present in solution under these experimental conditions [221]. The question arises: where does the rest of the excitation go in i-$(dC)_{10}$?

The fluorescence decay curves of dCp and $(dC)_{10}$ samples were recorded in the range of 310-450 nm. The decay curves dCp and ss-$(dC)_{10}$ are practically independent of the wavelength (Figs. 4.1.3-4.1.5). Fig. 4.1.7 shows the decay curves for i-$(dC)_{10}$ recorded at wavelengths of 340, 380 and 420 nm. Fig. 4.1.8 presents the curves registered in a wide range of wavelengths on a long time scale. In the long-wavelength part of the spectrum, slow components, which become dominant at 380 nm, are observed on the decay curves (Fig. 4.1.7). Three exponents can satisfactory approximate all decay curves in the range of 310-450 nm. The global decomposition gives the decay times of 310 fs, 2 ps, and 25 ps. Fig. 4.1.9 shows the spectra of the components.

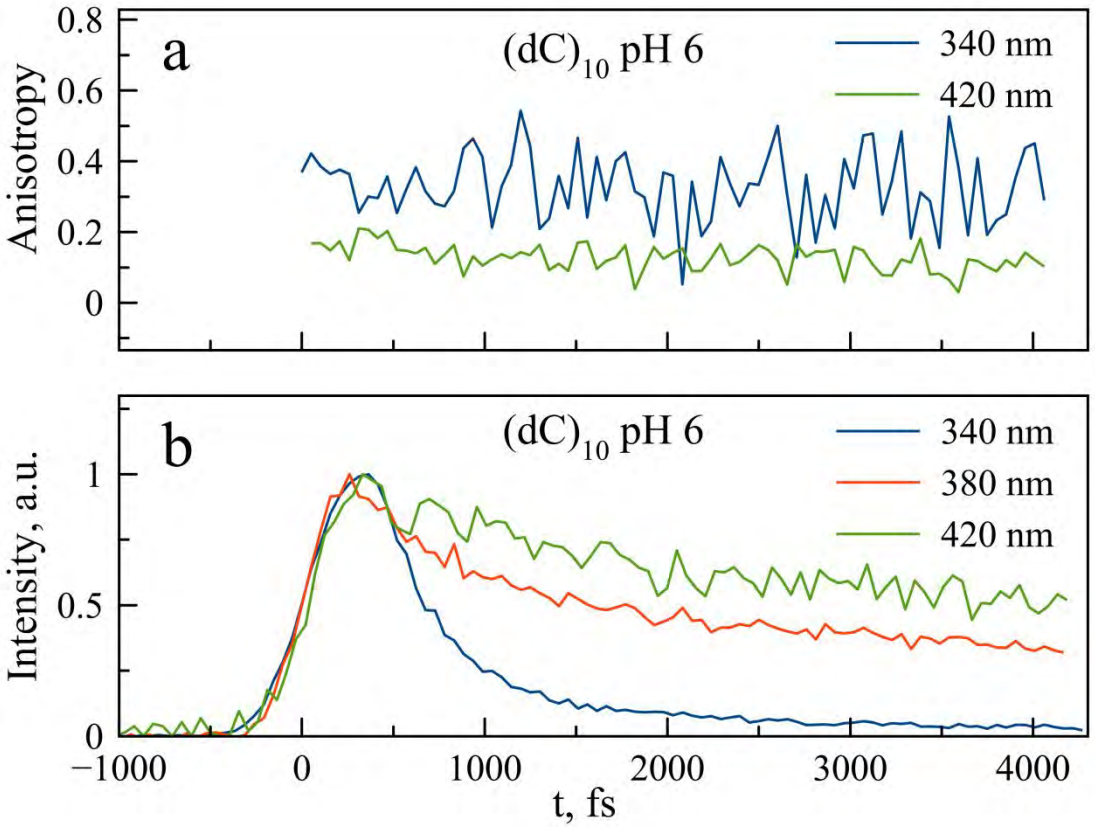


Fig. 4.1.7. Luminescence anisotropy (a) and intensity (b) decay curves of $(dC)_{10}$ in water [58].

The short-wavelength component with the decay time of 310 fs can obviously be attributed to the monomer emission, which has a similar decay time and fluorescence anisotropy (even though the short-wavelength maximum in the spectrum is slightly red-shifted, which is explained by a sharp decrease in the device sensitivity in the short-wavelength region of the spectrum). The component with a decay time of 2 ps (Fig. 4.1.9) is located in the long-wavelength part of the spectrum with a maximum at about 370 nm. Another long-lived component is even more shifted to the red side. The fluorescence anisotropy of the long-wavelength slow components is much less than the monomer emission at a wavelength of 340 nm (Fig. 4.1.7), which indicates their various emission dipole moments.

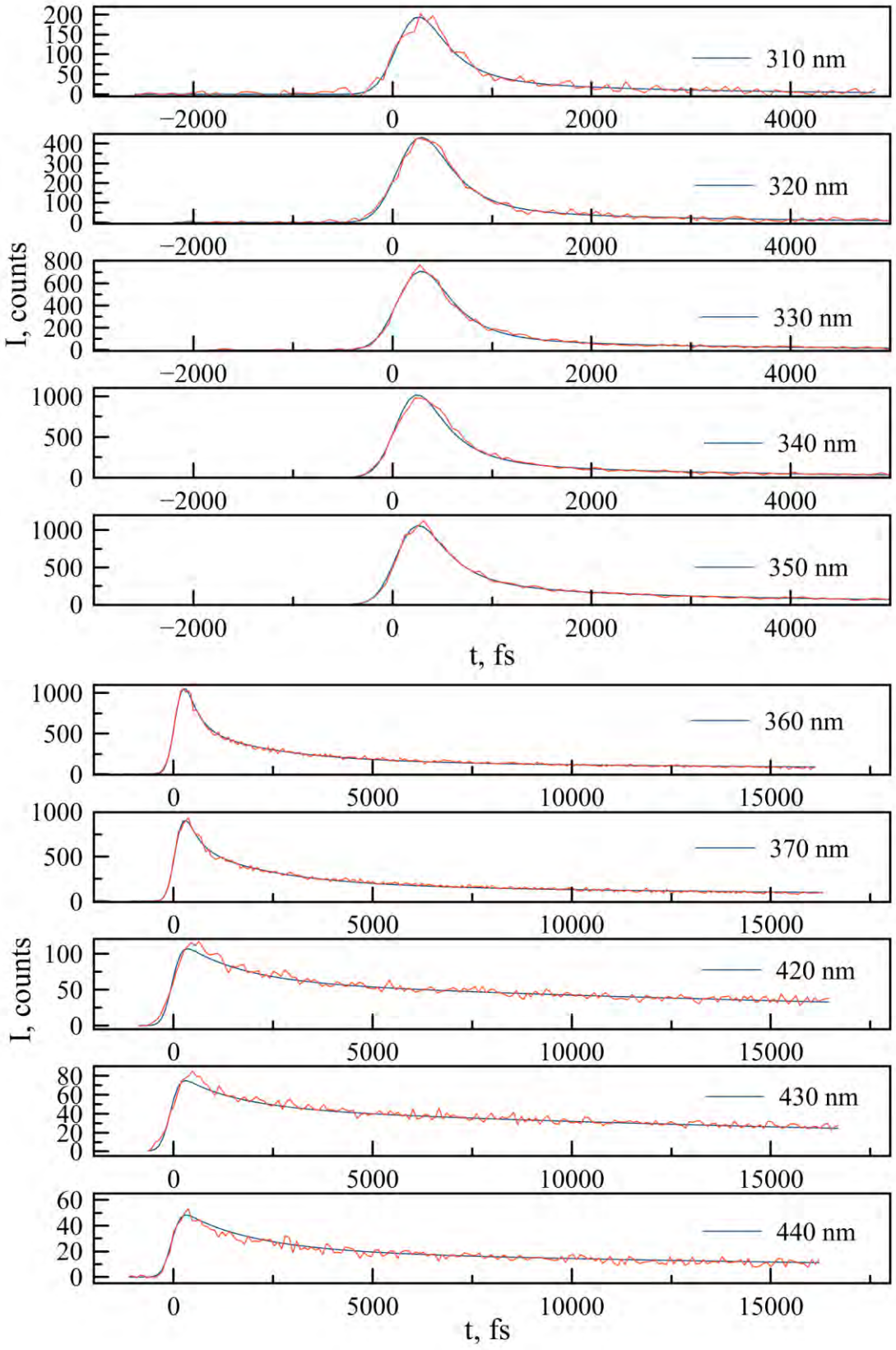


Fig. 4.1.8. Luminescence decay traces and fits for $(dC)_{10}$ in water at pH 6 [58].

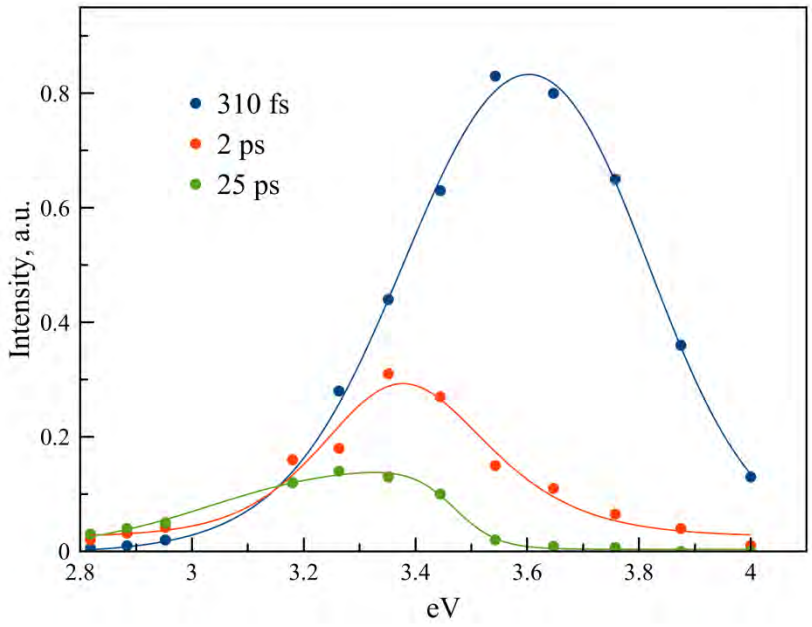


Fig. 4.1.9. The decay-associated spectra of the slow and fast decay components of $(dC)_{10}$ in water at pH 6 [58].

The red-shifted fluorescence bands in DNAs are usually referred to as the so-called excimer fluorescence of DNA components [11, 232, 74]. A high quantum yield of formation of long-lived excimers in semi-protonated cytosine strands in the i-motif conformation was observed in transient absorption measurements (pump-probe) [233-235], but their lifetimes were much longer (hundreds of ps). It should be noted that the term "excimer" (excited dimer) means two molecules of the same type, one in the electronically excited state and the other in the ground state, which, when the distance is reduced, form an excimer as a result of mutual attraction [236]. Theoretical calculations [75, 237] in accordance with experimental observations [72, 73] predict indeed the formation of such states, e.g. in the adenine strands with a "face-to-face" base stacking arrangement. Formation of excimers in the case of stacked cytosines is also predicted by the theory [238] and observed experimentally [233-235, 239]. A similar fluorescence band, red-shifted by 360 nm and observed for polyadenines, was assigned to excimers [74, 75]. There are two factors that contradict the assignment of the 370-nm emission in i-$(dC)_{10}$ to the excimer. Firstly, the fluorescence rise time in the range of 370-450 nm is faster than the time resolution of the device, i.e., less than 100 fs (Fig. 4.1.7-4.1.8).In

addition, a significant decrease in the signal for i-$(dC)_{10}$ at 340 nm compared with the dCp signal (Fig. 4.1.6) indicates that the emitting state of 370 nm is formed very quickly, directly from the Franck-Condon state rather than from the locally excited monomer. A time interval of less than 100 fs is too short for any mutual approach of the bases. Secondly, the Stokes shift of the monomer, as well as the spectral shift between the low-energy transition of ~4.1 eV in the i-$(dC)_{10}$ absorption spectrum (Fig. 4.1.1) and the spectral maximum of the slow component in the spectrum (Fig. 4.1.9) have the same value equal to approximately 0.8 eV. Therefore, emission with a wavelength of 370 nm comes directly from state with the lowest energy in the stacking structure of semi-protonated $(dC)_{10}$ without any structural rearrangement of the bases. The analysis of various densities (Table 3.6.2) indicated that both exciton and CT/CR interactions contribute to the lowest S1 state of the i-motif. It means that the emissive state of 370 nm is in fact a delocalized state.

It is reasonable to assume that subsequent charge transfer in the emissive state probably leads to the formation of long-lived CT excimers observed on a subnanosecond time scale, since the fluorescence lifetime of the local excited state does not change in $(dC)_{10}$. For instance, it has recently been suggested that, in the case of adenine strands, the charge transfer states form within 3 ps [240]. Fig. 4.1.10 illustrates the proposed scheme of the photoprocesses in the i-$(dC)_{10}$ structure.

The question is why the delocalized excitonic state has a relatively long lifetime of several picoseconds, which is not observed in other DNA structures. Two factors in the i-$(dC)_{10}$ structure may be responsible for this effect: the large value of exciton splitting, comparable with the absorption bandwidth and/or contribution of CT/CR term to the exciton state with the lowest energy. Further theoretical and experimental studies are required for a more detailed description of the structure and dynamics of the excited states in the i-motif.

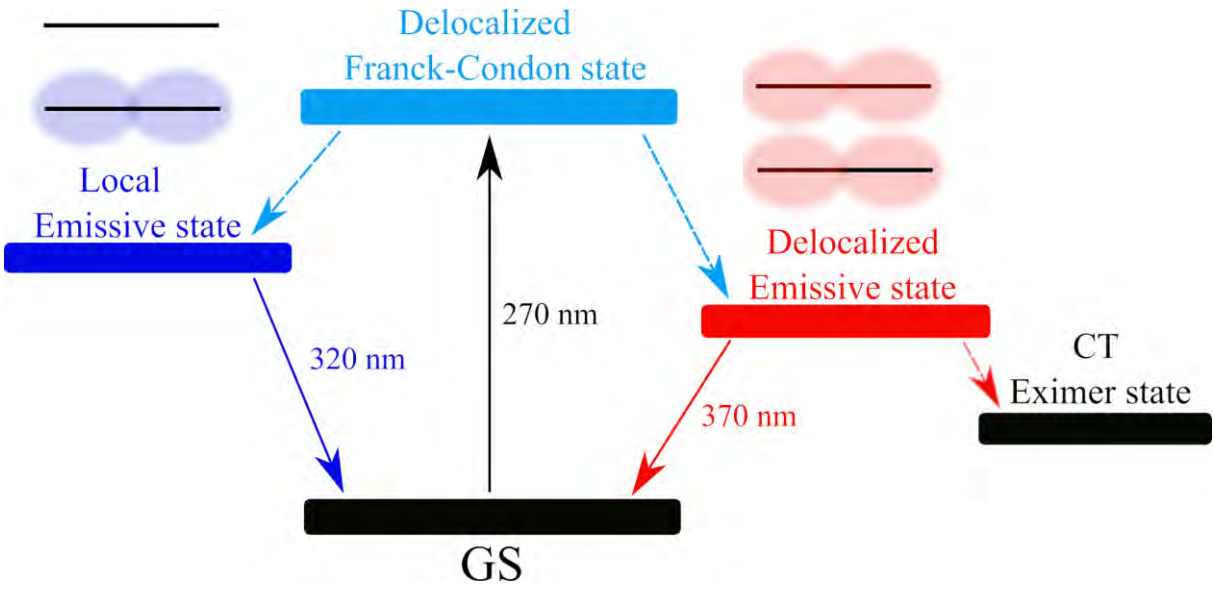


Fig. 4.1.10. Photoprocesses in i-motif structure of $(dC)_{10}$ [58].

4.2. Luminescence kinetics of high molecular weight DNA.

For thymus macromolecular DNA (CT DNA), the maximum of the fluorescence spectrum upon excitation at the maximum of the absorption band (260 nm), as for most polymeric DNA forms, is close to the maximum fluorescence of monomers at about 330 nm (Fig. 4.2.1). The fluorescence lifetime of the main component is about 300 fs (Fig. 4.2.2). Such a short lifetime leads to a very low quantum yield of the fluorescence (about 10^{-4}). A similar lifetime was obtained in [31].

An increase in DNA concentration to 10^{-3} M allowed us to record the fluorescence emission spectrum upon excitation at the long-wavelength absorption edge. The maximum of the emission spectrum is shifted to 420 nm, and a band is observed in the excitation spectrum at 320 nm, which are much the same as in the case of poly-A and AMP aggregates [96, 98]. This observation allows us to conclude that low-lying excited states are also observed in natural DNA, similarly to the states observed for model DNA systems. These states are obviously rare, and they are not visible in the absorption spectrum due to a sufficiently low concentration and absorption coefficient.

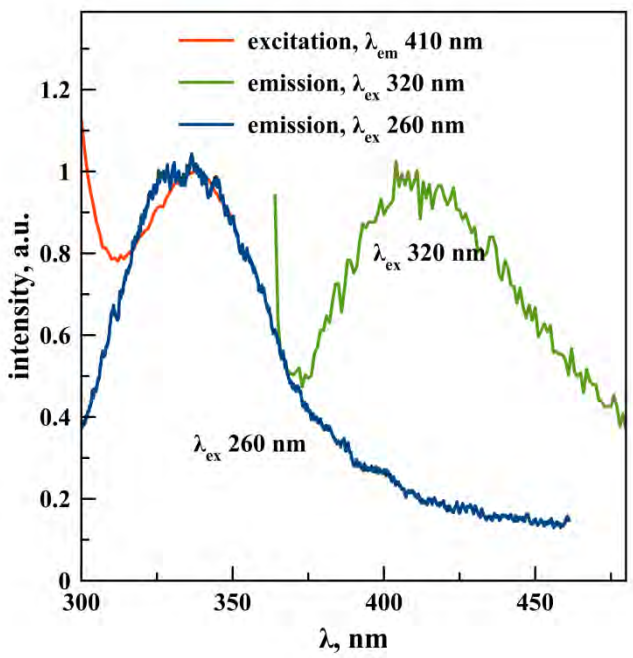


Fig. 4.2.1. Fluorescence emission spectra of CT DNA upon excitation at 260 nm and 320 nm; fluorescence excitation, λ_{em} 410 nm.

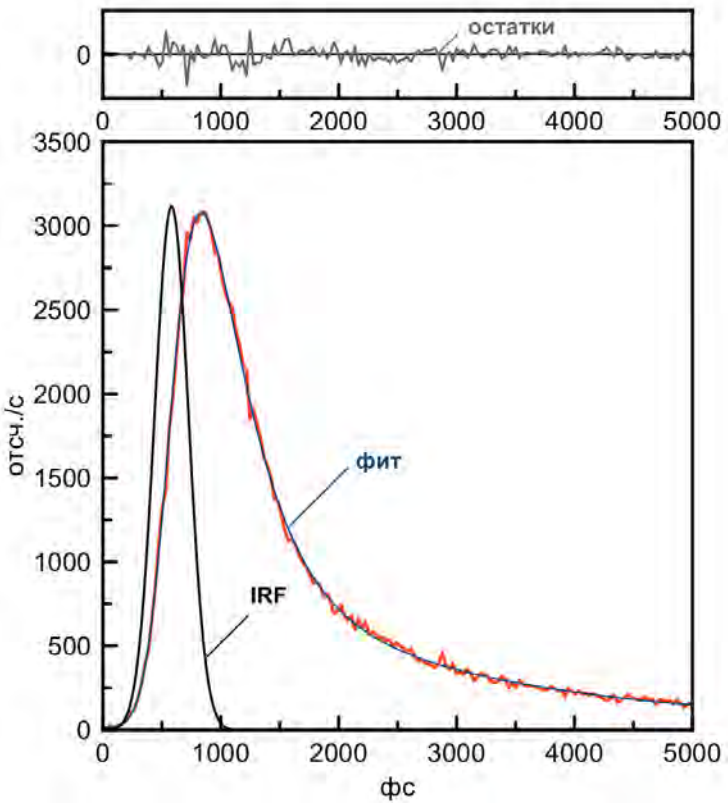


Fig. 4.2.2. DNA fluorescence decay curve obtained by the up-conversion method in the femtosecond range ($\lambda_в$ = 267 нм).

However, in the case of stacking of adenine bases and in the case of natural DNA, they have a relatively large quantum yield of emission, which is confirmed by their relatively high fluorescence lifetimes. Thus, the DNA fluorescence decay curve upon excitation of 340 nm (Fig. 4.2.3), in addition to the main fast component lying outside the setup resolution (~ 0.1 ns), reveals components with the decay times of 1.4 and 5.7 ns, which make up the bulk of the integrated intensity observed in the stationary spectrum.

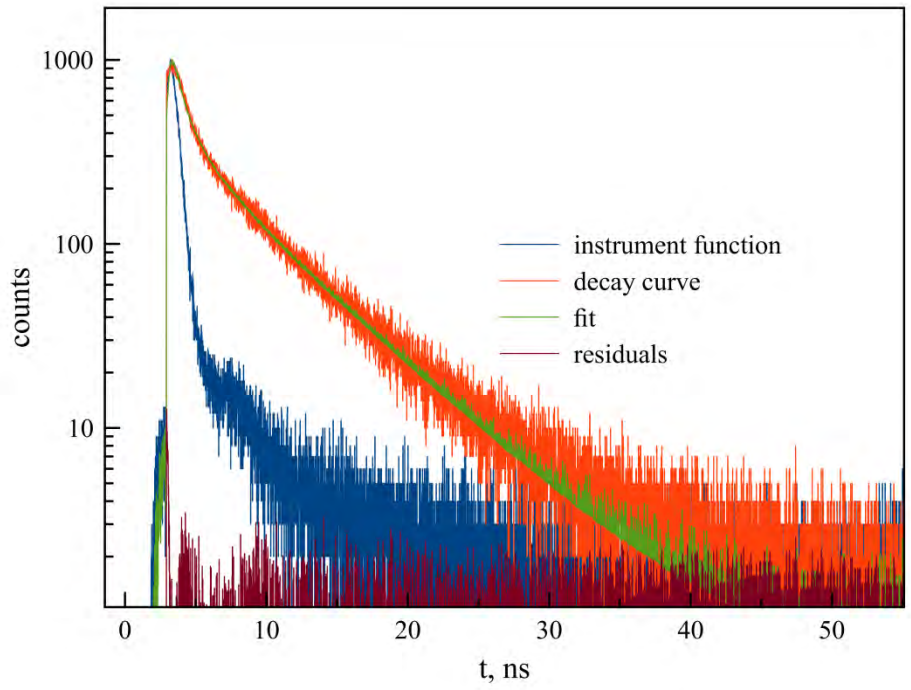


Fig. 4.2.3. Fluorescence decay curve of a 10-3 M DNA solution upon excitation at 340 nm (emission at 410 nm). Fit: 4.4exp (-t / 12 ps) + 0.0038exp (-t / 1.4 ns) + 0.0024exp (-t / 5.7 ns).

4.3. Energy transfer in DNA.

Technical difficulties in the deep UV range and the heterogeneity of the studied systems hinder probing of the exciton dynamics in NAs. As an alternative approach, experiments on energy transfer using the bases as donors and molecules bound to NAs as acceptors can be used to measure the distance and efficiency of the excitation energy

migration and the exciton length in NAs directly. Effective energy migration over long distances could reveal the excitonic transfer mechanism and long-range delocalization of the exciton, since the fluorescence lifetime of DNAs is usually hundreds of femtoseconds [84]. Experiments with dyes and also with modified bases as energy acceptors demonstrated energy transfer from only the nearest neighboring bases [12, 112, 115, 116, 241]. It seems that the general opinion [13] that the exciton interaction is limited by the interaction of the nearest neighbor coupling along the strand is confirmed by this fact. Obviously, long-range coherent effects do not play a major role in the relatively low-efficient energy trapping by the acceptors used in those systems. We also investigated the efficiency of energy transfer in the double-stranded form of thymus natural DNA using an intercalating dye as an acceptor. The efficiency of energy transfer from DNA bases to acceptors was evaluated as follows. Generally, the signal intensity in the visible range of the excitation spectrum (I, divided by the excitation intensity) is determined by the absorption extinction coefficient of the acceptor (ε_A) and a constant factor proportional to acceptor concentration (C), optical path (l), fluorescence quantum yield (Φ), and instrumental factors (k) as follows:

$$I(\lambda) = \varepsilon_A(\lambda) 2.3 C l \Phi k \qquad (4.3.1).$$

If the excitation spectrum is normalized to 1, it can be expressed as:

$$I(\lambda) = \varepsilon_A(\lambda) / \varepsilon_A^{max} \qquad (4.3.2),$$

where ε_A^{max} denotes the acceptor extinction coefficient at visible maximum peak in the absorption spectrum. $I(\lambda)$ is a dimensionless quantity normalized to 1 at visible maximum.

In the DNA absorption range, an additional term representing the excitation transfer from DNA to the acceptor is added:

$$I(\lambda) = (\varepsilon_A(\lambda) + \varepsilon_{DNA}(\lambda) \cdot \varphi) 2.3 C l \Phi k \qquad (4.3.3),$$

where ε_{DNA} denotes the DNA extinction coefficient, and φ is the excitation transfer efficiency. The normalized excitation spectrum is then expressed as:

$$I(\lambda) = \varepsilon_A(\lambda)/\varepsilon_A^{max} + \varepsilon_{DNA}(\lambda)/\varepsilon_A^{max} \cdot \varphi \quad (4.3.4),$$

or, in a simpler form, as:

$$I(\lambda) = A_A(\lambda) + A_{DNA}(\lambda) \cdot \varphi \quad (4.3.5),$$

where:

$$A_A(\lambda) = \varepsilon_A(\lambda)/\varepsilon_A^{max} \quad (4.3.6),$$

$$A_{DNA}(\lambda) = \varepsilon_{DNA}(\lambda)/\varepsilon_A^{max} \quad (4.3.7).$$

The absorption of the complex (A) can be approximated by the sum of the intrinsic acceptor absorption and the DNA absorption:

$$A(\lambda) = A_A(\lambda) + A_{DNA}(\lambda) \quad (4.3.8).$$

In doing so, we neglect the base–acceptor interaction that can affect the DNA extinction coefficient. Similar to $I(\lambda)$, $A(\lambda)$ is also a dimensionless quantity normalized to 1 at visible maximum. For the fluorescent acceptor-DNA complex, the absorption spectrum of the complex is known. Subsequently, from Eq. 4.3.5 and 4.3.8, the transfer efficiency can be derived as:

$$\varphi = 1 - \frac{A(\lambda) - I(\lambda)}{A_{DNA}(\lambda)} \quad (4.3.9).$$

In this equation, the absorption $A(\lambda)$ and fluorescence excitation $I(\lambda)$ spectra of the acceptor-DNA complex are normalized to 1 at visible maximum. The DNA absorption spectrum $A_{DNA}(\lambda)$ is scaled using Eq. 4.3.7. In the case when the absorption of the acceptor in the region of 260 nm can be subtracted from the absorption spectrum of the complex or in the case when $A_A(\lambda) \ll A_{DNA}(\lambda) \cdot \phi$ at the DNA absorption maximum, Eq. 4.3.5 can be written as:

$$I(260) \cong A_{DNA}(260) \cdot \varphi \quad (4.3.10).$$

Using Eq. 4.3.7 and the averaged molar extinction coefficient of DNA bases ($\boldsymbol{\varepsilon_{DNA\,b.}}$), Eq. 4.3.10 can be written as:

$$I(260) \cong \varepsilon_{DNA\,b.}(260) \cdot N/\varepsilon_A^{max} \cdot \varphi \qquad (4.3.11),$$

where *N* is the number of DNA monomers transferring energy to the acceptor. If more than one acceptor contributes to the emission excited at 260 nm, then the left part of the equation is scaled by factor *f*, i.e., the fractional intensity of the acceptor at the emission wavelength:

$$I(260) \cdot f = \varepsilon_{DNA\,b.}(260) \cdot N/\varepsilon_A^{max} \cdot \varphi \qquad (4.3.12).$$

Then the apparent number of bases transferring the excitation energy to the acceptor can be estimated from the fluorescence excitation spectrum as follows:

$$\boldsymbol{N = \frac{I(260) \cdot f \cdot \varepsilon_A^{max}}{\varepsilon_{DNA\,b.}(260) \cdot \varphi}} \qquad (4.3.13).$$

The fluorescence emission and excitation spectra of the AO–DNA complex and the absorption spectrum of AO in the complex obtained as the differential AO–DNA/DNA spectrum are presented in Fig. 4.3.1. AO binds to DNA by intercalation when the AO/DNA ratio is used (0.01) [242-244]. The AO–DNA complex shows a characteristic spectral shift of the excitation and emission maxima compared to the AO solution (Fig. 4.3.2). The dye weight in the UV range of the complex excitation spectrum can be estimated from the differential absorption spectrum of acridine-DNA – bare DNA complex.

Eq. 4.3.13 was used to estimate the number of bases transferring the energy to the dye, where *I(260)* now means the difference between the excitation spectrum of the AO–DNA complex and the AO absorption spectrum normalized to 1, *f*=1, and ε_A^{max} is the extinction coefficient for AO at the visible maximum ($6 \cdot 10^4$ M^{-1} cm^{-1} [243, 244]). We got *N*=4.3±0.5 bases from Eq. 4.3.13. This value denotes that energy transfer in the AO–DNA complex occurred from the four nearest neighboring bases (being in the van der Waals contact with the dye) in the double-stranded DNA, which is consistent with other studies of energy transfer in similar DNA–acceptor complexes [12].

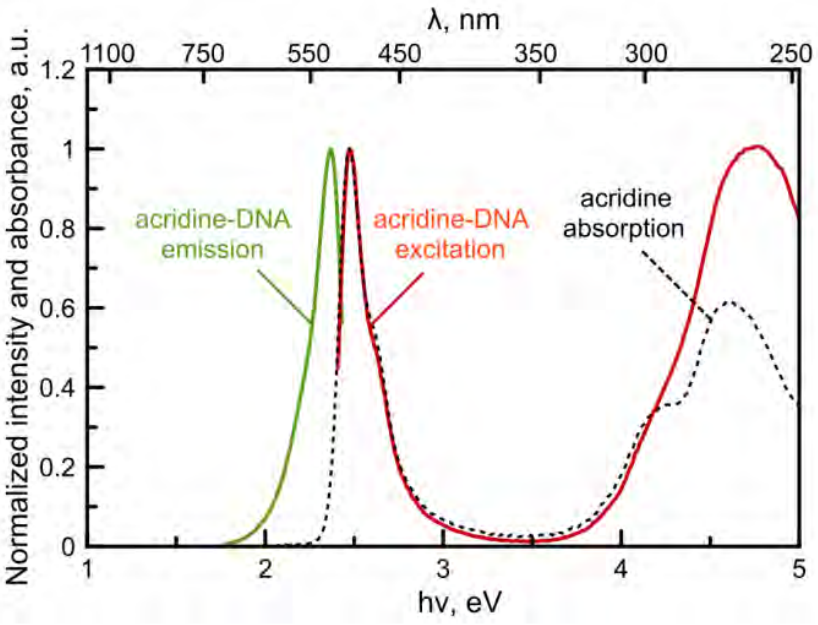


Fig. 4.3.1. Fluorescence emission (green) and excitation (red) spectra of AO–DNA complex; dashed line indicates differential AO–DNA/DNA spectrum [56].

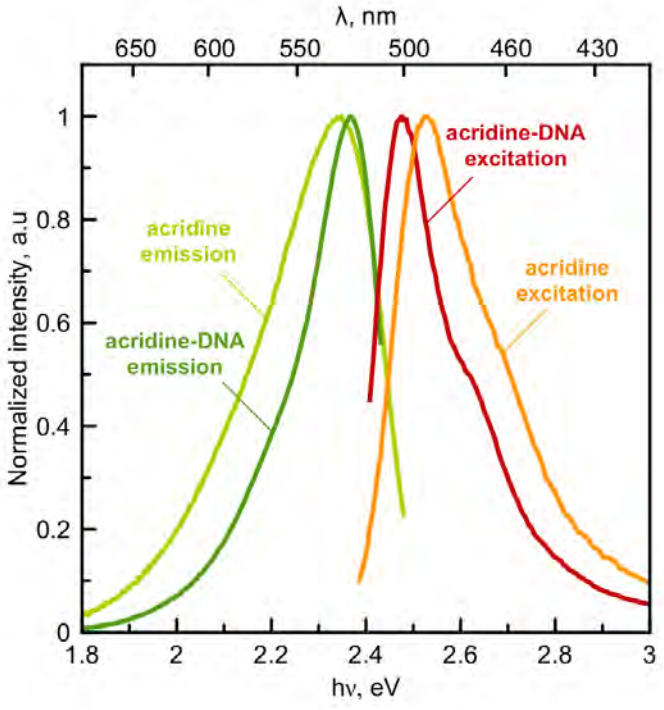


Fig. 4.3.2. Excitation and emission spectra of AO and AO–DNA complex. $C_{DNA}=6\cdot10^{-5}$ M, $C_{AO}=6\cdot10^{-7}$ M (AO:DNA phosphate ratio = 1:100) [56].

4.4. Conclusions to Chapter 4.

The dynamics of the femtosecond excited state for the two conformations of the oligonucleotide $(dC)_{10}$ is significantly different. For a single-stranded form of DNA, the fluorescence decay time is the same as that for the monomer (about 300 fs), which indicates the localization of the excitation on the monomer and subsequent fluorescence from the monomeric excited state. For the i-motif form, a fast relaxation to the lower exciton (delocalized) state occurs in less than 100 fs. The lifetime of the exciton state is about 2 ps, which was not previously observed for other forms of DNA. The exciton state likely decays to the exciplex state of charge transfer nature.

Two types of luminescent states were found for the native double-stranded form of thymus DNA: a short-wave state with a lifetime of about 300 fs and a long-wave state excited at the long-wavelength edge of the absorption spectrum decaying in the nanosecond range. Different types of emission states most likely refer to different conformations of base stacking in DNA. Long-wave luminescence probably belongs to a small fraction of the bases with a stacking form, characterized by low-energy transitions and capable of interacting with solar radiation most efficiently.

In the complex of DNA with the AO intercalating dye, the excitation energy transfer to the dye molecule occurs only from the 4 nearest bases in direct contact with the dye. This result indicates a low degree of delocalization of excitation in this form of DNA.

CHAPTER 5. STRUCTURE OF DNA COMPLEXES WITH SILVER CLUSTERS. ELECTRON-EXCITED STATES OF THE COMPLEXES

It was shown in [117] that luminescent silver clusters bound to DNA can act as effective acceptors of electronic excitation. Silver clusters can thus be used to estimate the radius of energy migration in DNA. However, the structure of the complexes of clusters with DNA, as well as the nature of the electronic states of the complexes, remained unknown. In this part of the dissertation, the problem of determining the structure of complexes and their photophysical characteristics was solved.

5.1. Structures of free silver clusters and their electronic excitation spectra.

We compared the obtained results with the experimental absorption spectra of clusters obtained in the inert gas matrices, to ensure that chosen method appropriately describes the spectra of free silver (Ag) clusters. The geometry optimization of silver clusters for the Ag_0^n and $Ag_+Ag_0^{(n-1)}$ structures, where n=1-6, was performed without any symmetry restrictions. To calculate the absorption spectra, the lowest energy configurations were chosen. Both the charged and neutral optimized silver clusters containing up to 6 atoms possess plane symmetry, which is in good agreement with previous calculations [138, 141, 245] (Fig. 5.1.1).

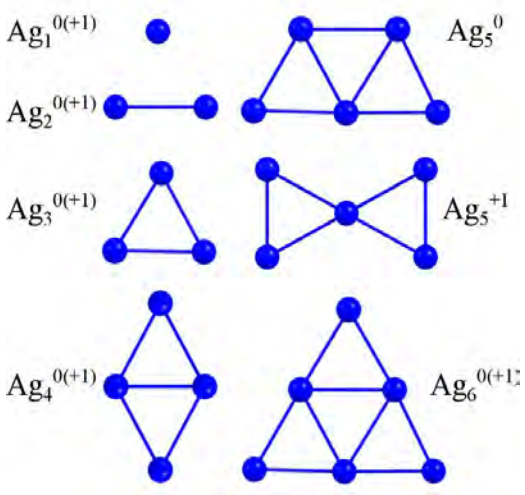


Fig. 5.1.1. Optimized structures of charged and neutral silver clusters [45].

Using the TD DFT method, further calculations of the optical properties were performed for the optimized structures. The calculation results for free planar neutral and charged clusters were in a good agreement with the low-temperature absorption spectra [45]. A feature of the luminescence excitation spectra of Ag clusters stabilized by polymer is that only one intense transition is observed in the visible range, and no intense transitions are observed up to the far UV region [117, 149, 246]. As for DNA clusters, all fluorescent complexes have low-energy band of high intensity, as well as DNA absorption band at about 5 eV with weak transitions in the gap [117, 149]. Accordingly, the structures of fluorescent clusters should possess this feature in their excitation spectrum. We examined the clusters of up to 8 atoms, having an elongated shape, so that each atom is bound to only one or two neighbors. The ability of the planar and thread-like clusters to self-form is the main difference between them. In contrast to planar shapes, the formation of elongated forms of clusters necessarily implies a bond with the polymer. In such a model, the absorption spectra of thread-like clusters determine the geometric parameters specified by the polymer chain. We developed various chains of up to 8 Ag atoms with imposed restrictions on the bending angles.

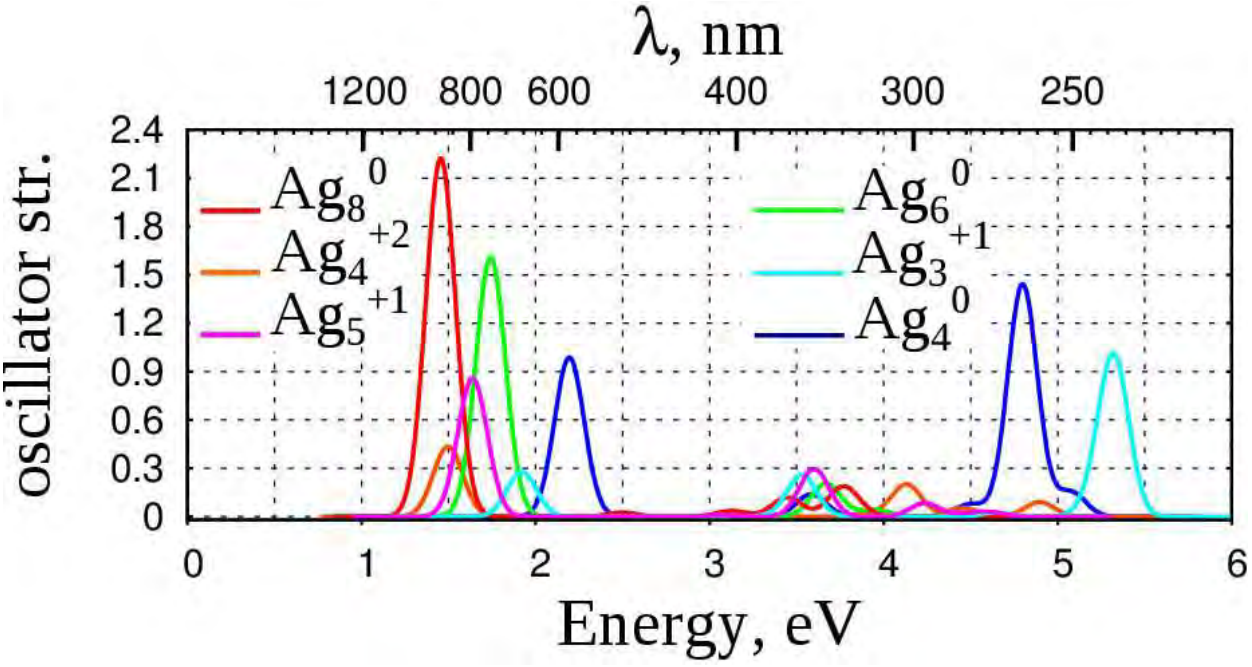


Fig. 5.1.2. Excitation spectra for thread-like clusters up to 8 Ag atoms [45].

Fig. 5.1.2 demonstrates the spectra for strictly linear chains of silver atoms of various charge. The spectra calculated for one-dimensional chains of the neutral and single-charged clusters are in good agreement with those obtained previously [142] by a similar method.

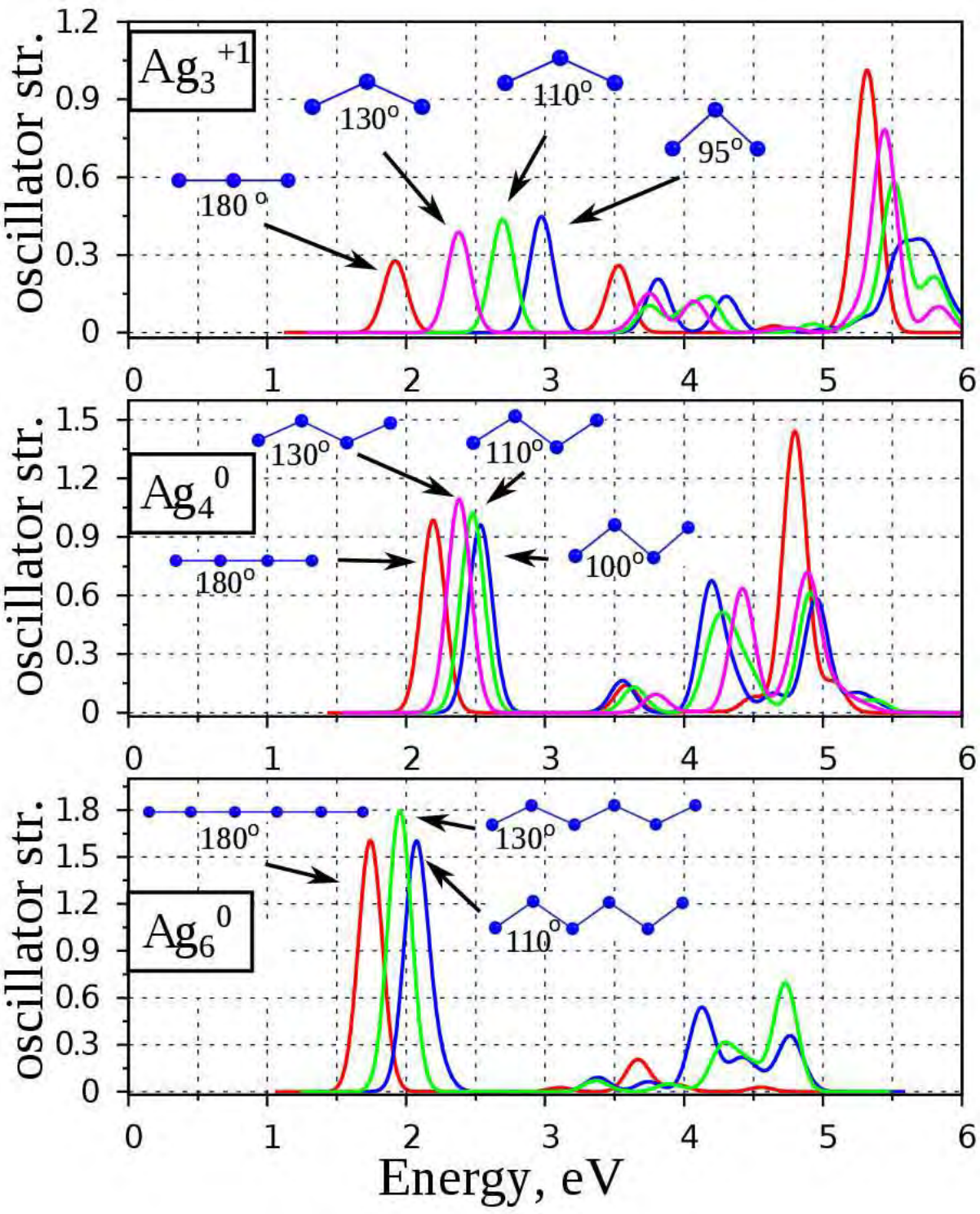


Fig. 5.1.3. Excitation spectra for thread-like Ag_3^{+1}, Ag_4^{0}, Ag_6^{0} clusters with the different bend angles [45].

It turned out that by simply changing the bending angle in the chain of atoms, one can obtain low-energy peaks that cover the entire visible region (~1.7-3 eV) in the excitation spectra (Fig. 5.1.3). The shape of the spectra of filamentous clusters, in contrast to planar and spherical clusters, corresponds to the shape of the excitation spectra of clusters stabilized by DNA. In this case, the spectral properties of clusters are determined by the charge, length and shape of the chain. However, the question of how this form of clusters can be stabilized in solution is arose. To solve this problem, we determined the detailed structures for a number of fluorescent complexes of clusters with oligonucleotides.

5.2. Cluster structures in complexes with a 12-mer DNA and their electronic excitation spectra.

In this part, we describe a new methodology for obtaining a detailed structure of the fluorescent Ag-DNA complexes. We synthesized three different types of Ag clusters on the same DNA template emitting from violet to red spectral range. Varying the nucleotide sequence and pH conditions allowed us to identify the sites of the clusters location. The stable structures of the fluorescent Ag-DNA complexes were obtained by QM/MM simulations. A reasonable agreement is observed between the experimental fluorescent excitation and excitation anisotropy spectra and the corresponding calculated spectra, which proves the validity of the obtained structures. The results of our calculations show that: 1) charged Ag_3^{+1} and Ag_4^{+2} clusters form the chromophoric core of Ag-DNA complex, capable of emitting in a wide spectral range; 2) spectral properties of the clusters are strongly affected by DNA matrix.

A 12-mer DNA 5’-CCTCCTTCCTCC-3’ sequence (DNA 1), and also 5’-CCACCTTCCACC-3’ (DNA 2) and 5’-CCTCCAACCTCC-3’ (DNA 3) similar palindrome sequences with replacement of thymines by adenines were used as templates for Ag clusters synthesis. DNA 1 sequence has been used earlier for the synthesis of red-emitting clusters [247].

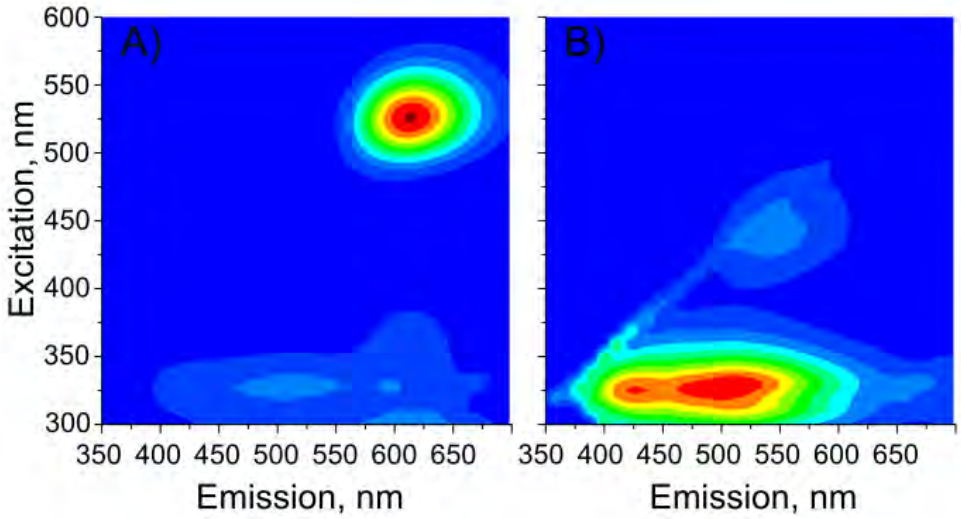


Fig. 5.2.1. 2D fluorescence contour plots of DNA 1 – Ag cluster complexes acquired in an hour (A), and two months (B) after synthesis [51].

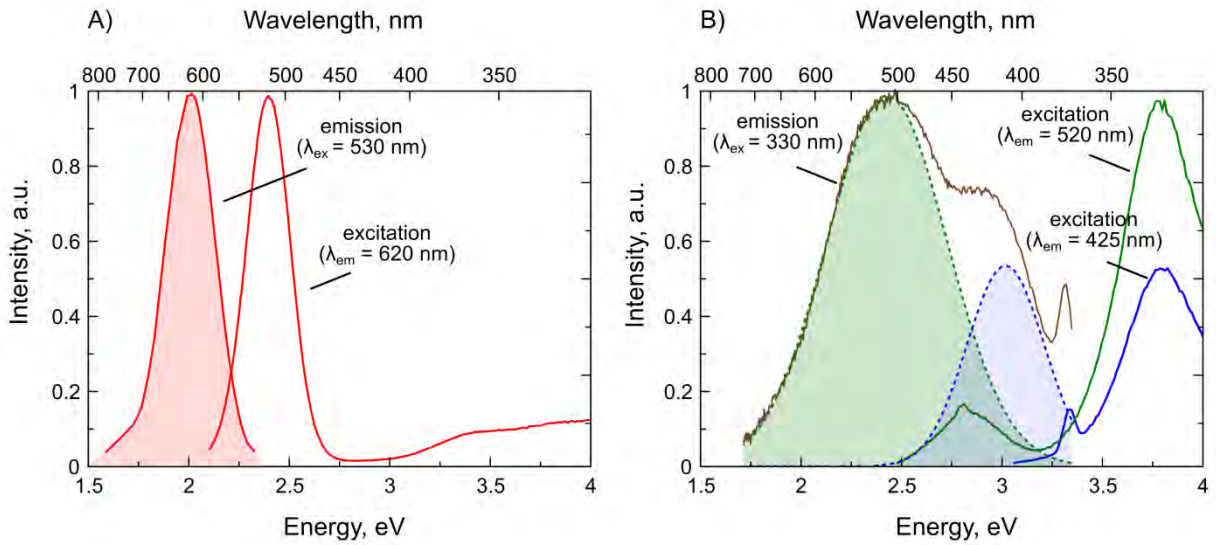


Fig. 5.2.2. Fluorescence emission and excitation spectra of three different Ag clusters on DNA 1. (A) – the red cluster, an hour after synthesis. (B) – the green and violet clusters, two months after synthesis; the emission spectrum is fitted with two Gaussians [51].

In this work, we optimized experimental conditions to get the clusters also emitting at shorter wavelengths. Thereby, the expected smaller size of the cluster facilitated QM calculations. In first hours after synthesis, a strong emission band appears at 620 nm, along with a weaker band at 510 nm (Fig. 5.2.1A). During subsequent aging of the solution, the emission band at 620 nm disappears, and a new band grows at 410 nm

(Fig. 5.2.1B). The observed three fluorescence emission bands in the violet, green and red spectral ranges evidently correspond to a mixture of three fluorescent complexes possessing different structures. The red cluster (620 nm), stable at acid pH, has the lowest excitation transition at 530 nm (Fig. 5.2.2A). The emission band of the green-emitting cluster at 510 nm has the lowest-energy excitation maximum at 440 nm, while the cluster emitting at 410 nm exhibits the lowest-energy transition at 330 nm (Fig. 5.2.2B). To the best of our knowledge, the fluorescent DNA-stabilized silver cluster with the excitation/emission maxima at 330/410 nm is observed for the first time.

The algorithm of finding the structure of fluorescent complexes was as follows. At the first stage, we determined structure of the DNA-Ag^+ precursor. Then modifications of the DNA sequence that do not affect secondary structure of the DNA-Ag^+ complex allowed us to determine probable binding sites of the clusters. In the next step, QM/MM optimized structures of the complexes were obtained. The number of silver atoms and their charge were taken so that the calculated electronic excitation spectra and excitation polarization spectra of the complexes match the corresponding experimental spectra. Thermal stability of the structures was checked by MD simulations. Agreement between the calculated and the experimental spectra verified the reliability of the obtained structures of the fluorescent complexes.

Complexation of Ag^+ cations with DNA bases provides formation of a secondary DNA structure stabilized by Ag^+-mediated C-C pairs, which is seen from the typical CD spectrum (Fig. 5.2.3) indicating C-Ag^+-C pairing [154, 156]. MS of the Ag^+-DNA complex (Table 5.2.1) exhibits a range of strand monomer products and no duplex products. These results suggest that DNA 1 forms a hairpin rather than a self-dimer structure. QM/MM equilibrium structure of the DNA 1 hairpin stabilized by Ag^+ cations [52] is shown in Fig. 5.2.4. Melting curve (Fig. 5.2.5), as well as CD spectrum (Fig. 5.2.3), shows that the DNA structure remains stable after formation of the clusters.

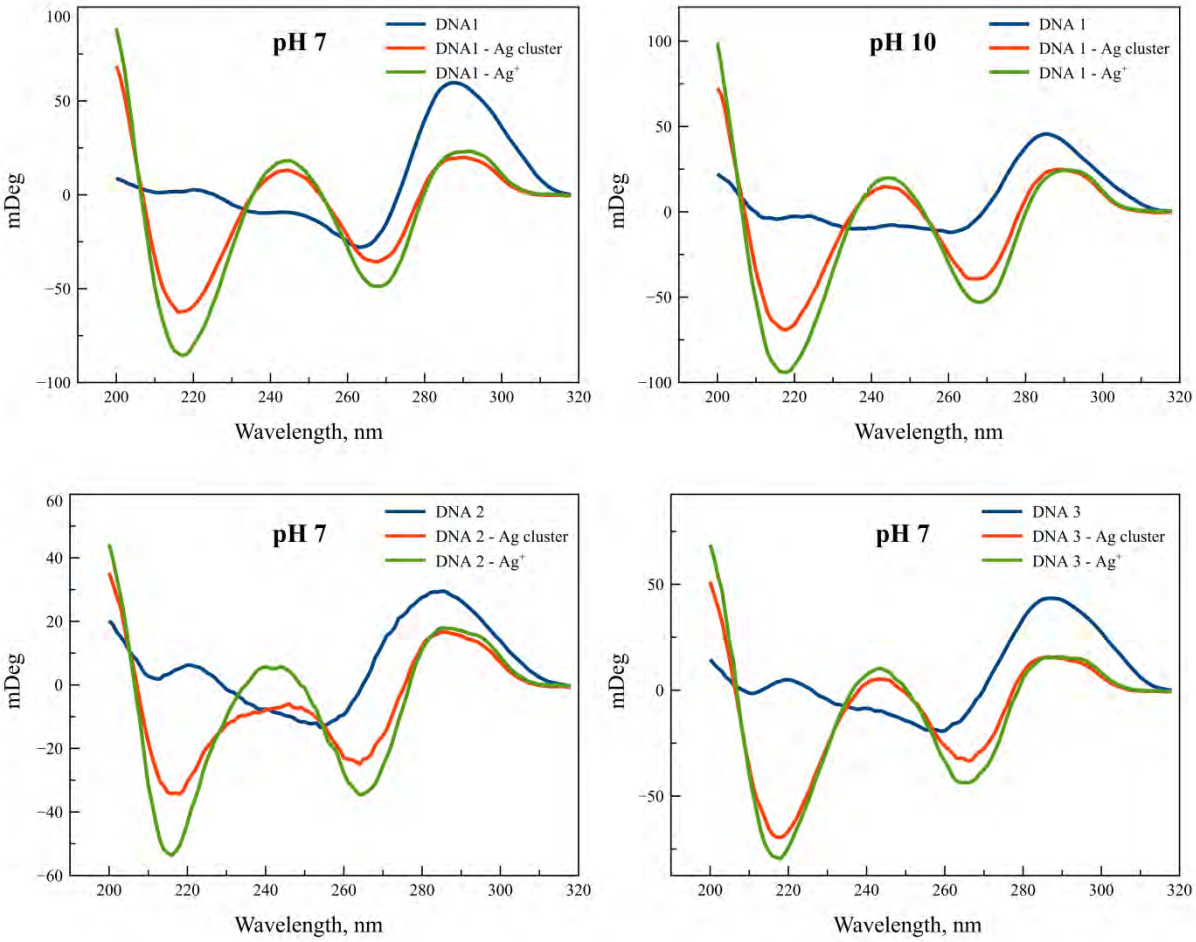


Fig. 5.2.3. CD spectra of different DNA templates and of their complexes with Ag^+ cations and Ag clusters at 0.5 Ag^+/base ratio [51].

Table 5.2.1. Mass distribution and the number of Ag^+ cations obtained for DNA 1, DNA 2, DNA 3 solutions at 0.5 Ag^+/base ratio for DNA 2 and DNA 3, and at 1 Ag+/base for DNA 1. All the peaks correspond to strand monomers [51].

DNA 1

Mass	Ag number	Counts
3784,22	3	2300
3888,05	4	3100
3950,25	5	2250
4055,14	5	3200
4115,2	6	1250
4225,14	7	2800
4285,14	7	1000
4390,13	8	1750

DNA 2

Mass	Ag number	Counts
3481,56	0	1400
3589,48	1	1900
3696,36	2	4900
3909.19	4	5000
3802,27	3	14200
3840,16	3	1800
3946,12	4	1300

DNA 3

Mass	Ag number	Counts
3801,28	3	12000
3810,3	3	5000
3839,24	3	12000
3909,15	4	12800
3917,22	4	6000
3947,1	4	1600
4015,06	5	1530

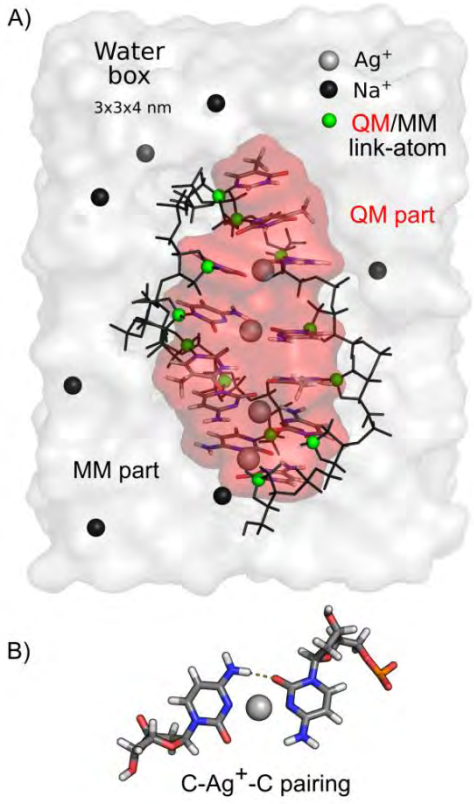


Fig. 5.2.4 (A) QM/MM-MD equilibrium structure of DNA 1 hairpin structure stabilized by C-Ag^+-C pairing; (B) the optimized geometry for the C-Ag^+-C pairs [51].

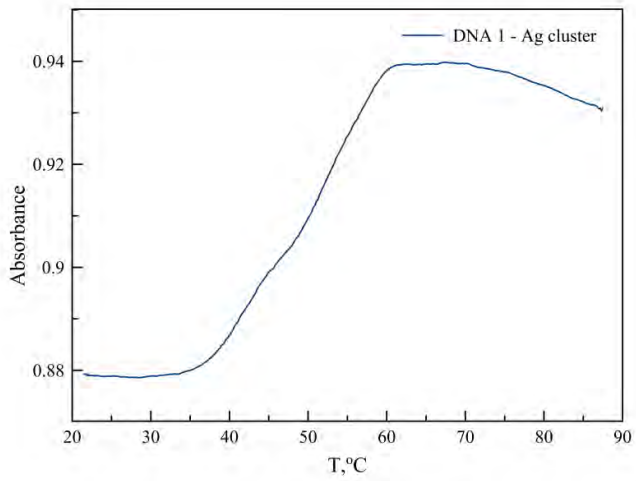


Fig. 5.2.5. Melting curve of DNA 1 – Ag cluster complex [51].

The next question was about the binding sites of the clusters. This was addressed by varying the DNA sequence and pH conditions. In doing so, it is essential that in all cases, the DNA matrix remains in hairpin form stabilized by C-Ag^+-C pairs, which can

be seen from the corresponding CD spectra and MS distributions (Fig. 5.2.3 and Table 5.2.1). Table 5.2.2 shows the fluorescence intensities of the emitting clusters on different DNA matrices measured at the same time after synthesis. As can be seen, the T>A substitution in the stem (DNA 2) does not affect the formation of the violet cluster, while the replacement of thymines by adenines in the loop (DNA 3) leads to disappearance of the violet emission.

Table 5.2.2. Fluorescence maxima, and intensities of Ag clusters on different DNA matrices [51].

DNA	λ_{max}, nm	Rel. intensity, %	Intensity, a.u.
DNA 1, pH 7 **CCTCCTTCCTCC**	410	20	0.3
	510	80	1.1
DNA 1, pH 10 **CCTCCTTCCTCC**	420	20	0.6
	500	80	2.7
DNA 2, pH 7 **CCACCTTCCACC**	420	20	0.3
	510	80	1.2
DNA 3, pH 7 **CCTCCAACCTCC**	500	100	3.0

These observations indicate that the violet cluster is bound with thymines in the loop. Another important feature is that deprotonation of N3 atoms of thymines at pH 10 practically does not affect the formation of the clusters on DNA 1 sequence. This means that one can preclude the binding of the violet cluster with N3 atoms of thymines at pH 7 (where a minor fraction of thymines may also be deprotonated). Thus, carbonyl

groups on thymines in the loop are probably the preferred binding sites for the violet cluster in DNA 1. Since the replacement of thymines by adenines does not affect formation of the green cluster, it is reasonable to assume that the green cluster is located on adjacent cytosines. This is also evidenced by the fact that the same green cluster is observed on polycytosines [249]. As to the red cluster, it is worth noting that Ag clusters emitting in that spectral range have been shown to be located at the mismatch sites [152]. In our case, TT mismatch in the stem of the hairpin can obviously be considered as the most probable location of the red cluster.

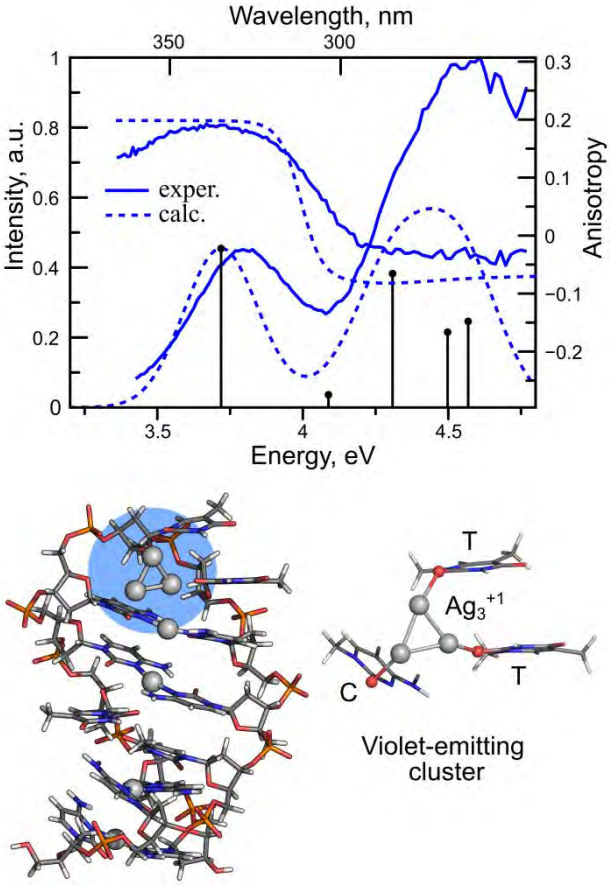


Fig. 5.2.6. QM/MM optimized structure and the corresponding excitation and excitation anisotropy spectra of the violet Ag_3^{+1} cluster bound to DNA 1 hairpin loop [51].

In Figure 5.2.6, presented are the obtained structure, calculated excitation and excitation anisotropy spectra for the violet-emitting Ag-DNA complex. As can be seen, a good agreement with the corresponding experimental spectra is observed. The

absorption band at 4.5 eV is mostly due to the DNA absorption and may be significantly underestimated in the calculated spectrum because of the small number of the bases in the QM part. The higher intensity observed for the peak at 4.5 eV in the experimental excitation spectrum compared to the calculated spectrum may be due to efficient energy transfer from DNA to the cluster, which is typical for Ag-DNA complexes [117].

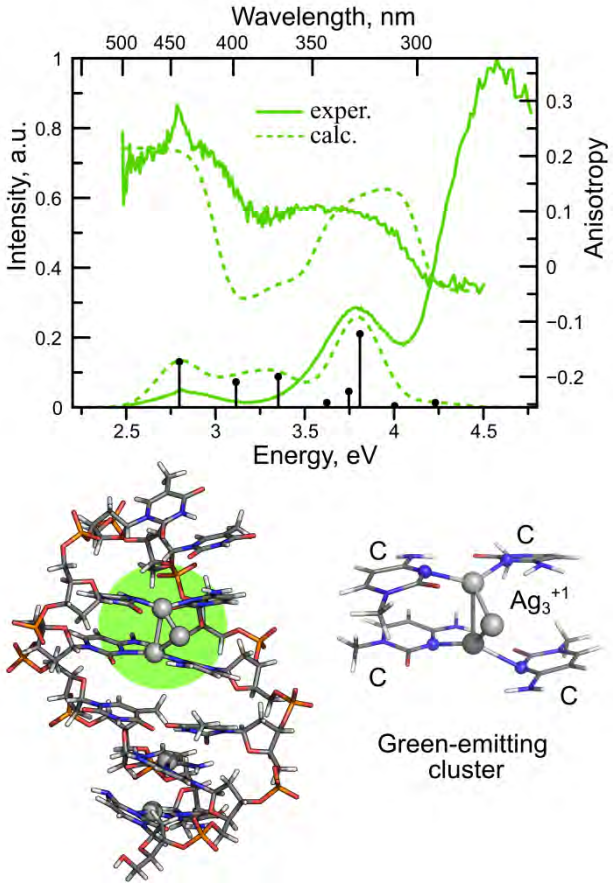


Fig. 5.2.7. QM/MM optimized structure and the corresponding excitation and excitation anisotropy spectra of the green Ag_3^{+1} cluster bound to the cytosine region at the base of DNA 1 hairpin [51].

The obtained structure and the corresponding spectra for the green-emitting Ag-DNA complex are shown in Fig. 5.2.7. The lower intensity of the first electronic transition at 2.8 eV compared to the higher energy transition at 3.8 eV can be considered as a fingerprint of this complex. This feature distinguishes it from other Ag-DNA fluorescent complexes, for which the lowest transition is always the most intensive in the range below 4 eV [117]. Our calculations satisfactorily reproduce this feature of the green

cluster. Remarkably, the spectrum of the Ag_3^{+1} cluster, bound in this case to cytosine N3 atoms, appears to differ significantly from that for the same Ag_3^{+1} cluster, but bound to carbonyl groups of thymine and cytosine (Fig. 5.2.6). This proves that cluster-matrix interactions can strongly affect the spectral properties of Ag-DNA complexes and indicates that optical spectra calculated for free Ag clusters as model systems may be not relevant to the corresponding Ag-ligand complexes.

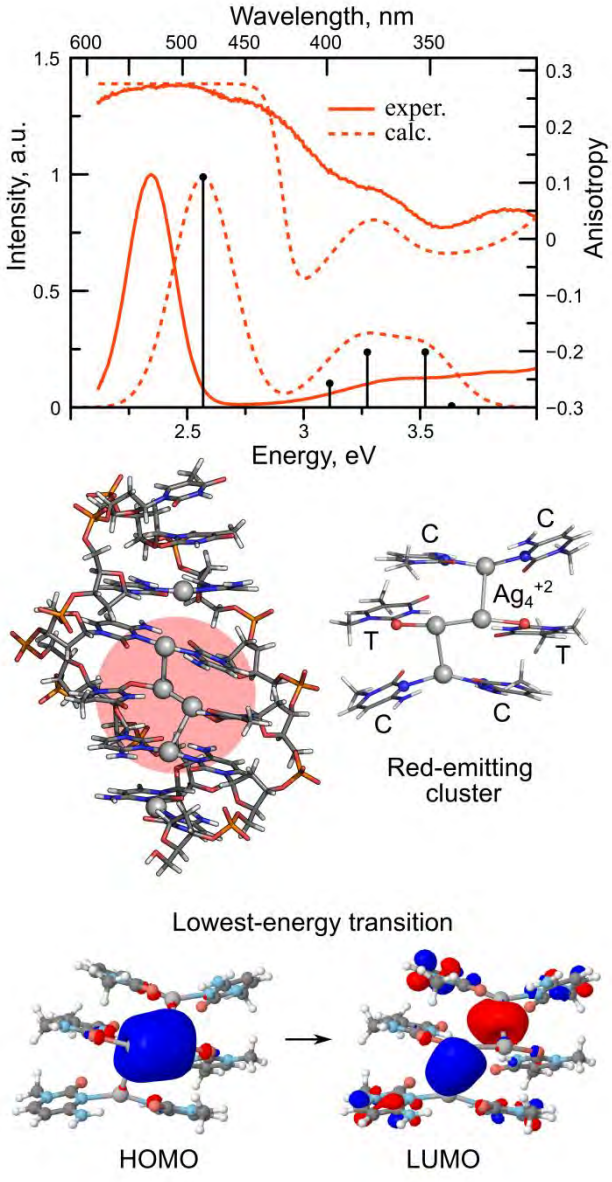


Fig. 5.2.8. QM/MM optimized structure and the corresponding excitation and excitation anisotropy spectra of the red Ag_4^{+2} cluster bound to TT site in DNA 1; NTO to the lower excited state [51].

The structure obtained for the red complex is presented in Fig. 5.2.8. A specific shape of the excitation spectrum of the red cluster, typical for most fluorescent Ag clusters, is evidently connected with a thread-like space shape of the cluster [142, 250, 251]. It appears that such shape can be realized only for a four-atomic Ag_4^{+2} cluster in the TT mismatch site. The analysis of the molecular orbitals involved in the lowest energy transition indicates that charge transfer between Ag cluster and DNA bases contributes to the excitation of the complex. Since carbonyl n orbitals and π orbitals of the bases are involved in the excitation transition, the position of the cluster peak at about 2.5 eV is highly sensitive to cluster-matrix interactions. Figures 5.2.9 and 5.2.10 show the effect of cluster binding to DNA bases on the excitation spectrum. Given this sensitivity, a shift of 0.2 eV in the calculated spectrum relative to the experimental maximum may be due to possible geometry optimization errors.

Additional confirmation of the forund structures can be seen from the calculated excitation anisotropy spectra. The features observed in experimental spectra are quite well reproduced by them (Fig. 5.2.6-5.2.8). A good agreement between the experimental and calculated spectra confirms the proposed structural models, since the anisotropy spectra are very sensitive to the relative direction of the transition dipole moments.

Our structural model for the fluorescent complexes differs from the common view. It is believed that the charge and size of metal clusters are uniquely determined by experimental values of the total metal charge and the total metal mass in metal-ligand complexes. In contrast to that, in our model, cluster, i.e., actually chromophoric part of the complex, consists only of a few silver atoms (Ag_3^{+1} or Ag_4^{+2}), and other positively charged Ag atoms are only need to stabilize the secondary structure of the ligand. It should be noted that three-atomic Ag clusters (Ag_3^{+1} or Ag_3^{0}) have been identified as fluorescent centers in rare gas matrices and zeolites [145-148].

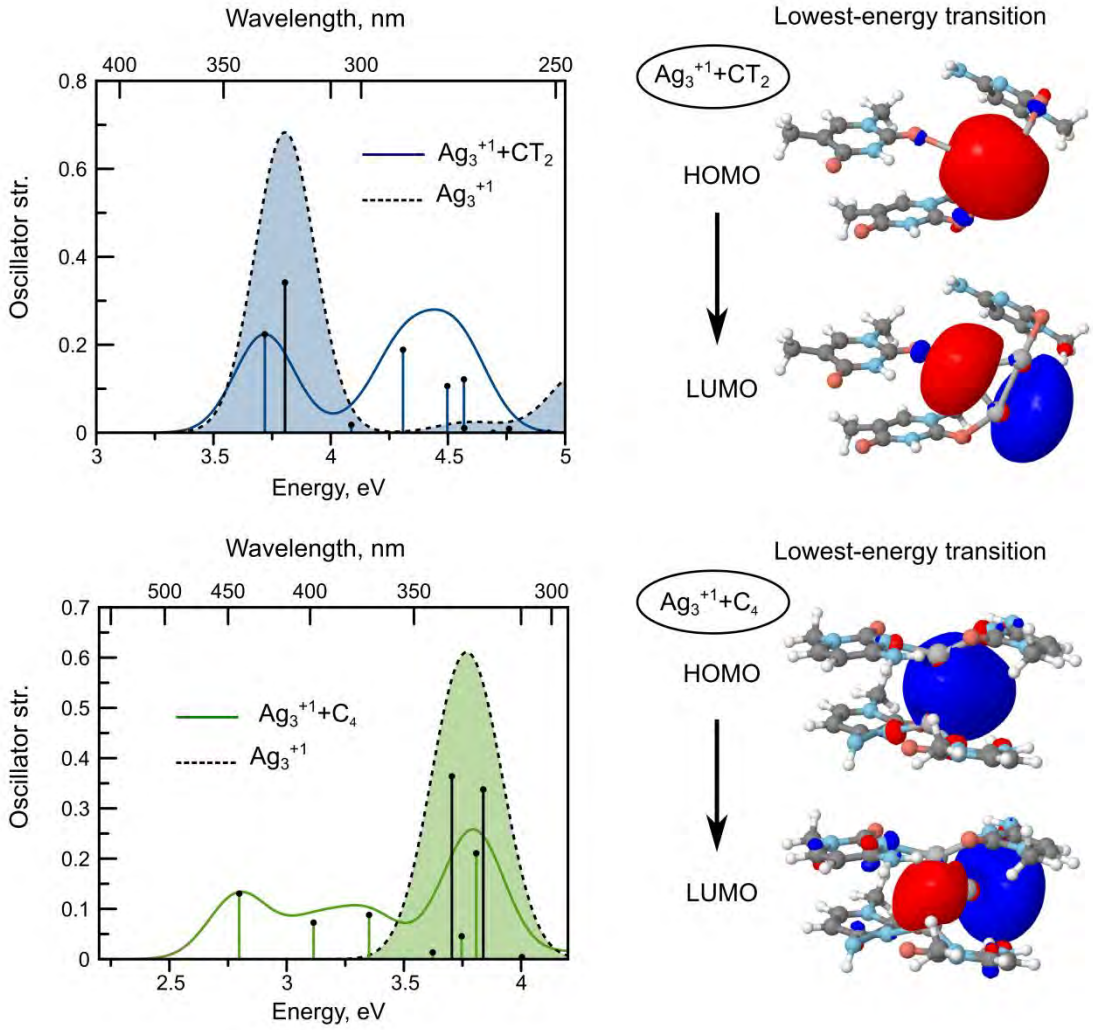


Fig. 5.2.9. Comparison of the calculated excitation spectra of Ag_3^{+1}-DNA violet (top) and green (bottom) emitters with the corresponding spectra for the free clusters; NTOs involved in the excitation of the complexes [51].

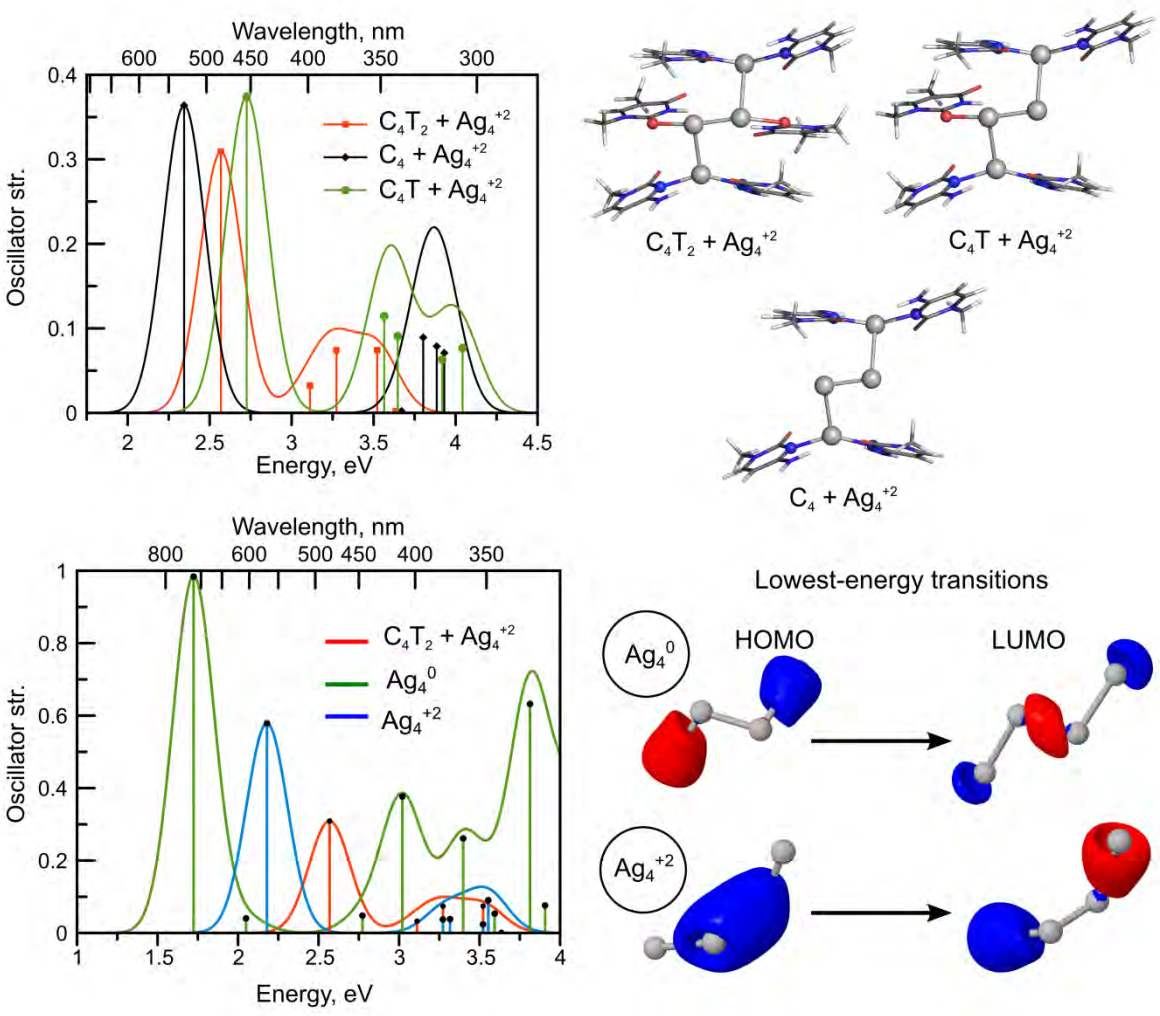


Fig. 5.2.10. Effect of thymine-Ag_4^{+2} cluster bonds on the electronic spectrum of the red-emitting Ag_N-DNA complex (top). C_4T_2+ Ag_4^{+2} – the structure obtained from QM/MM-MD simulations; C_4T+ Ag_4^{+2} and C_4+ Ag_4^{+2} – the same cluster with one Ag-T bond and with no Ag-T bonds. Comparison of the calculated excitation spectrum of Ag_4^{+2}-DNA red emitter (bottom) with the corresponding spectra for free Ag_4^{+2} and Ag_4^{0} clusters; NTOs involved in the excitation of free Ag_4^{+2} and Ag_4^{0} clusters [51].

5.3. Complexes of silver ions and clusters with a 15-mer DNA.

A similar approach was used to determine the structure of the luminescent cluster on the oligonucleotide 5'-CGCCCCCCTCGGCGT-3 '. It the first stage, we studied the interaction of Ag^+ ions with DNA and the structure of the DNA-Ag^+ complex. First, the binding sites of silver ions with DNA were determined experimentally. For this purpose, we studied the XPS spectra of the complexes [55].

The quality of pure DNA sample, that is, stoichiometry and chemical composition, was checked before considering complexes of DNA with silver. For this purpose, an overview XPS spectrum was obtained in a wide range of binding energies. Fig. 5.3.1 shows a schematic chemical structure of a DNA strand fragment consisting of cytosine, thymine and guanine bases. Table 5.3.1 summarizes the distribution of components related to specific chemical groups of DNA [252] and demonstrates the correspondence of experimental and theoretical values for each group in the sample.

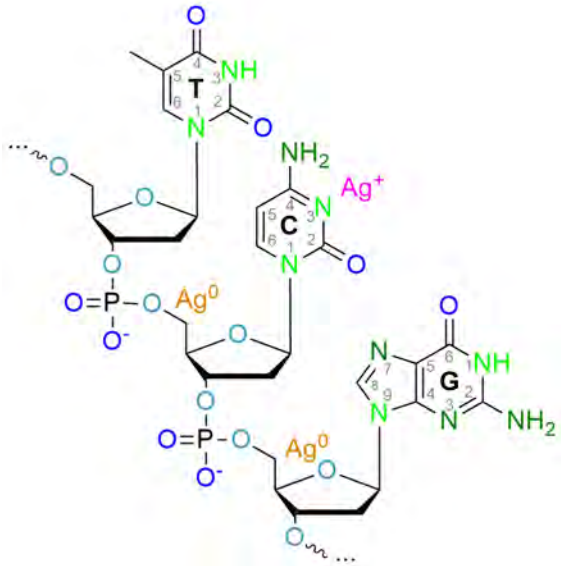


Fig. 5.3.1. Schematic representation of the DNA strand fragment with thymine (T), cytosine (C), and guanine (G) bases. Color representation corresponds to that used in decomposition of the core-level spectra shown in Fig. 1 and 2. O_I – blue, O_{II} – light blue, N_I – green, N_{II} – light green. Identified Ag^+ and Ag^0 binding sites are also shown [55].

Fig. 5.3.2 and 5.3.3 show the detailed XPS spectra of high resolution together with decomposition into components, which allows to determine the percentage of each component, for a more thorough analysis of the chemical composition. The N 1s spectrum (Fig. 5.3.2, bottom) can be decomposed in two peaks arising as a result of various chemical states of nitrogen atoms. The N_I peak with a binding energy of 399.4 eV corresponds to nitrogen atoms in C-NH_2, C=N-C groups, while the N_{II} component at 400.8 eV can be attributed to the electron emission from nitrogen atoms in the N-C-O and N-C=O groups. It should be noted that the measured nitrogen concentrations were close to the expected values in theory. The O 1s spectrum (Fig. 5.3.3, bottom) can also be decomposed into two components, where O_I with an energy of 531.3 eV corresponds to C=O, P=O, P-O^- groups and O_{II} with a maximum of 532.8 eV can be referred to C-O-C, C-O-P groups of DNA. The O_{II} component may also include a band of oxygen from water adsorbed on graphite cleavage defects or on a DNA film. Actually, we observed an XPS band with a maximum of 532.4 eV on a HOPG substrate with a dried drop of pure water. It was also discovered that the total experimental fraction of oxygen component is slightly higher than theoretically expected, apparently due to uncontrolled water content in the DNA film and graphite clefts. The detailed analysis of the O 1s spectrum of DNA under our conditions, for these reasons, is highly uncertain due to the uncontrolled presence of water in the samples.

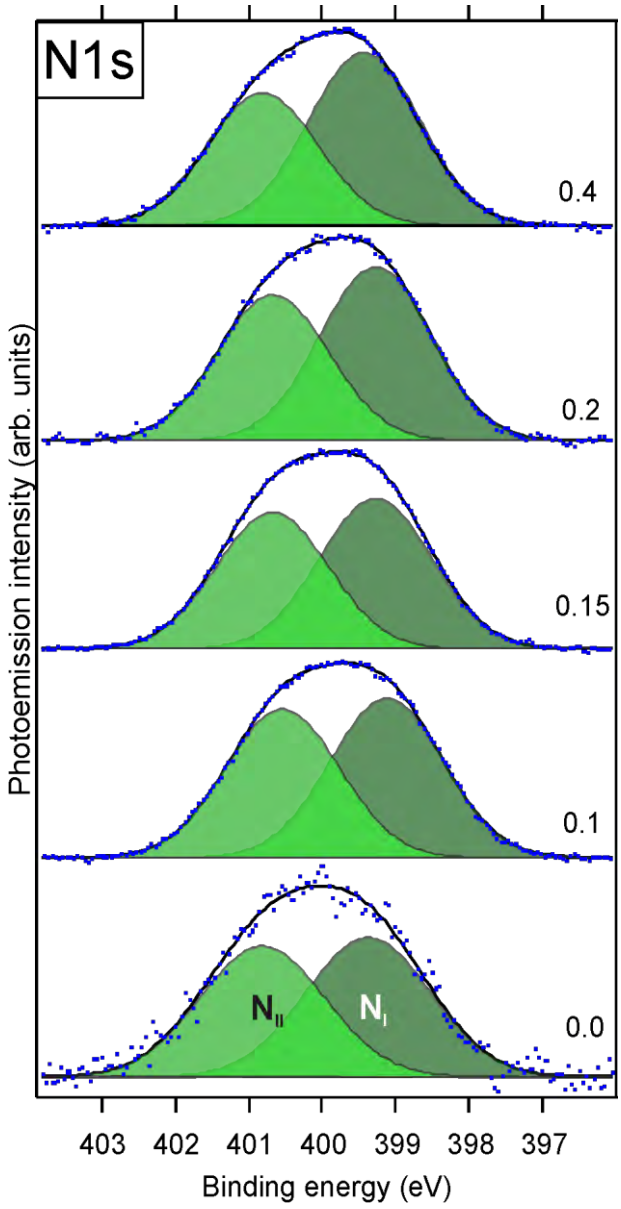


Fig. 5.3.2. Evolution of core-level N 1s spectrum of the Ag^{+}-DNA sample with increasing *r*. The spectra are normalized by integral area and fitted by two components. Values of $r = [Ag^{+}]/[DNA_{base}]$ are shown at the right [55].

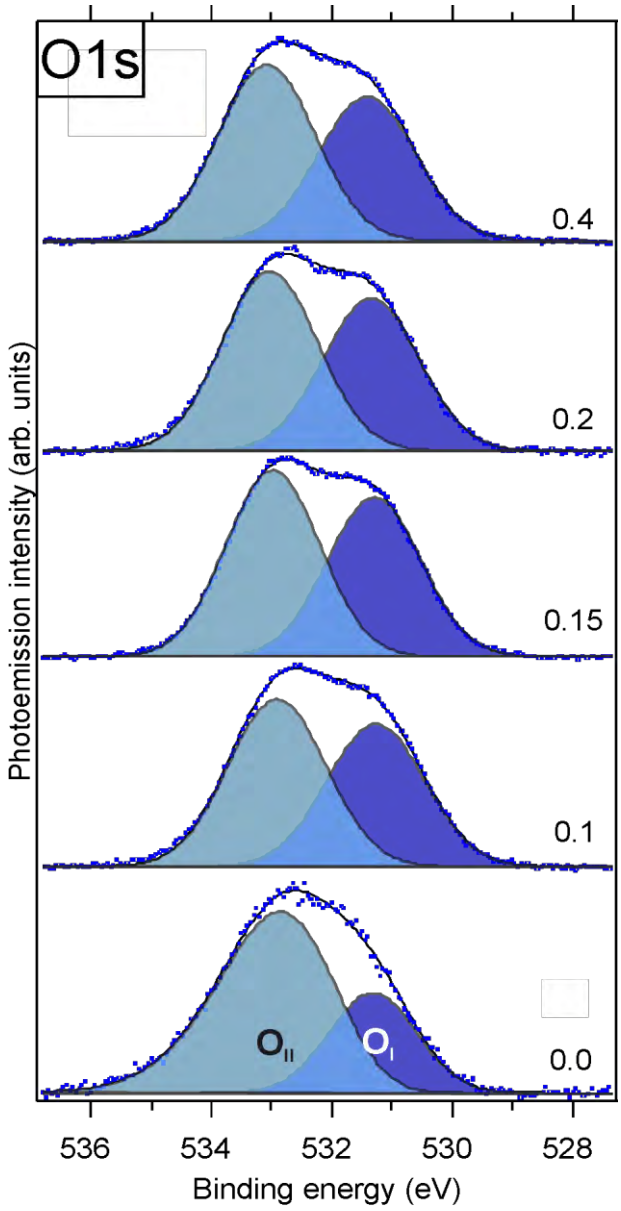


Fig. 5.3.3. Evolution of core-level O 1s spectrum of the Ag^+-DNA sample with increasing *r*. The spectra are normalized by integral area and fitted by two components. Values of $r = [Ag^+]/[DNA_{base}]$ are shown at the right [55].

Table 5.3.1. Binding energies of the PE components of pure DNA sample together with the assigned chemical structures detected with Al K_α excitation [55].

Core level	**Chemical group**	**Comp. name**	**BE exp. [55], eV**	**BE [252], eV**	**Overall exp. occurrence, a.u.**	**Overall theor. occurrence, a.u.**
N 1s	$C\text{-}NH_2$, C=N-C	N_I	399.4	399.1	3.5	3.6
	N-C-O, N-C=O	N_{II}	400.8	400.7		
O 1s	C=O, P=O, P-O-	O_I	531.3	531.6	10.1	6.4
	C-O-C, C-O-P	O_{II}	532.8	533.3		
P 2p	PO_4^-		133.5	133.8	1.0	1.0

The N 1s XPS spectrum of the DNA-Ag^+ complexes demonstrates a clear redistribution between the N_I and N_{II} components with an increase in Ag/DNA ratio (Fig. 5.3.2). This behavior can be interpreted as a shift in the fraction of the N_{II} component towards lower binding energies. An increase of electron density at N_{II}-sites as the result of Ag^+ binding to the N_{II} nitrogen atoms is implied by this effect. The only possible N_{II} sites in the 15-mer DNA are N3 cytosine atoms (Fig. 5.3.1). Thus, for a given $r \leq 0.4$ and a cytosine content (60% base), most Ag+ ions bind to N3 cytosine atoms, which corresponds to the accepted notions in the literature [253-255]. Ag+ ions can also bind to N7 guanine atoms [253], the only sites of the NI type. However, a high cytosine/guanine ratio (9/4) in DNA implies preferential binding of Ag+ ions to cytosines.

Fig. 5.3.3 illustrates the O 1s spectrum evolution with an increase in $[Ag^+]/[DNA_{base}]$ ratio. An excess of the O_{II} is observed for a pure DNA sample, which was explained above by the contribution of water on the HOPG surface. It is noteworthy that for $r \geq 0.1$, the observed O/P ratio achieves the expected value of 6.4, and no substantial spectral change is observed in the range of r = 0.1-0.4, which means the absence of interaction of Ag^+ ions with oxygen atoms. This fact is consistent with the generally accepted opinion that Ag^+ ions primarily interact with nitrogens of DNA bases [253-256]. Thus, in the oligonucleotide 5'-CGCCCCCCTCTCGGCGT-3', silver ions are predominantly bound to N3 cytosine atoms. As noted above, the interaction of silver ions with cytosines in DNA leads, as a rule, to the formation of non-canonical C-Ag + -C pairs and, accordingly, to the formation of hairpins (as for the 12-mer) or duplexes. For this 15-mer DNA, the formation of duplex was experimentally established [132].

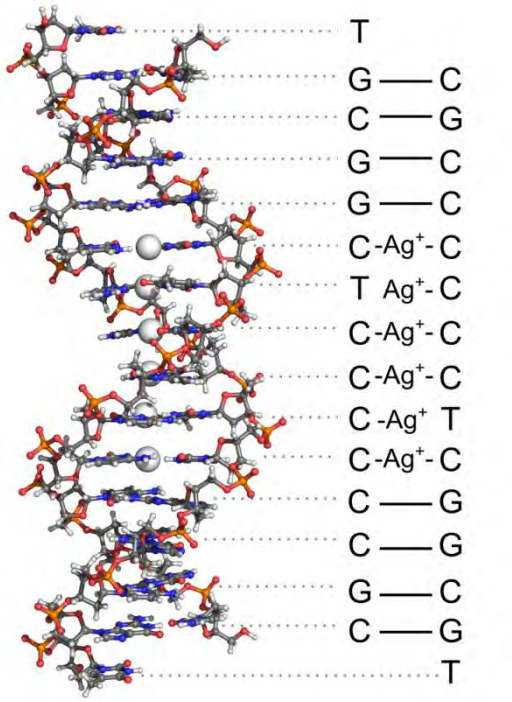


Fig. 5.3.4. QM/MM equilibrium structure of a self-dimer of DNA 15-mer 5'-CGCCCCCCTCGGCGT-3' complexed with 6 silver ions [56].

It the next stage, we obtained the QM/MM optimized structure of the DNA-Ag^{+} complex. The optimized structure of the 15-mer DNA duplex stabilized with Ag^{+} ions bound with N3 atoms is shown in Fig. 5.3.4. After that, modifications to the DNA sequence allowed us to identify possible cluster binding sites. Thus, replacing thymine with cytosine in the middle of the sequence results in disappearance of emission with a wavelength of the 560 nm (Fig. 5.3.5). This indicates that atoms of the Ag cluster are associated with the C-T mismatches, as was in the case of the Ag_4^{+2} cluster on the 12-mer DNA [51] and Ag on the DNA duplex [152].

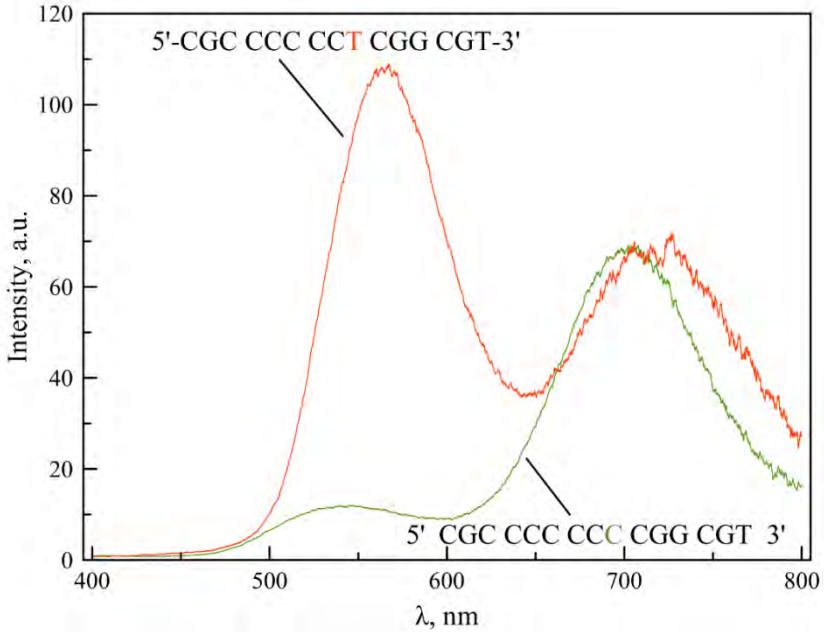


Fig. 5.3.5. Fluorescence emission spectra of Ag clusters synthesized on the original 15-mer DNA (red) and on the 15-mer with T9-C9 substitution (green) [56].

Then the QM/MM simulations of the system were carried out with silver atoms added at the C-T mismatches. The number of Ag atoms and cluster charge were varied until a reasonable agreement was reached between the experimental and calculated spectra of the cluster. Fig. 5.3.6 shows thus found structure, obtained for the chromophoric core of the Ag_6^{+2}-DNA complex. Fig. 5.3.7 illustrates the calculated excitation spectrum of the cluster. The obtained larger size of this cluster in comparison with the Ag_4^{+2} cluster correlates well with the fact that its experimental absorption

cross-section is twice higher than that of the Ag_4^{+2} cluster (as can be seen from the calculated spectra and experimental values of the absorption coefficient).

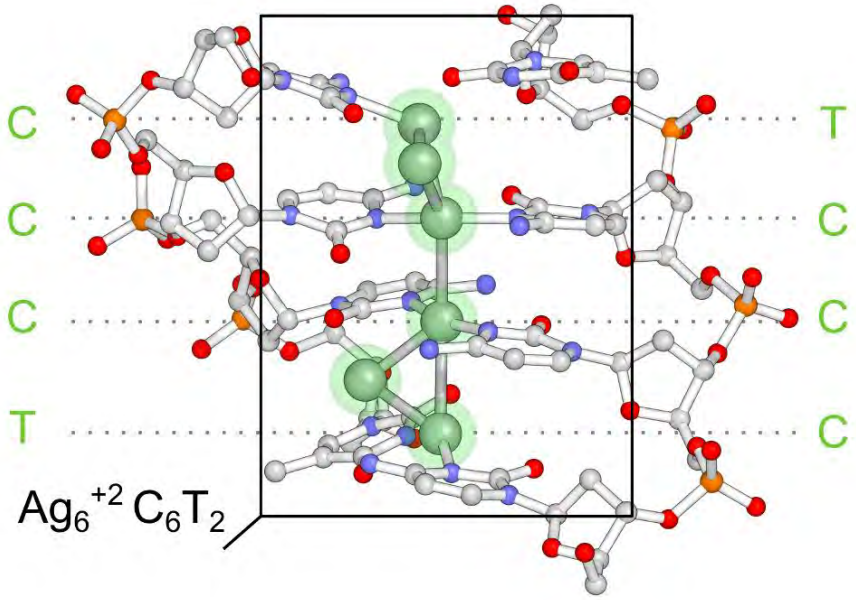


Fig. 5.3.6. QM/MM optimized structure of the chromophoric core of the complex of Ag_6^{+2} cluster with the 15-mer DNA duplex [56].

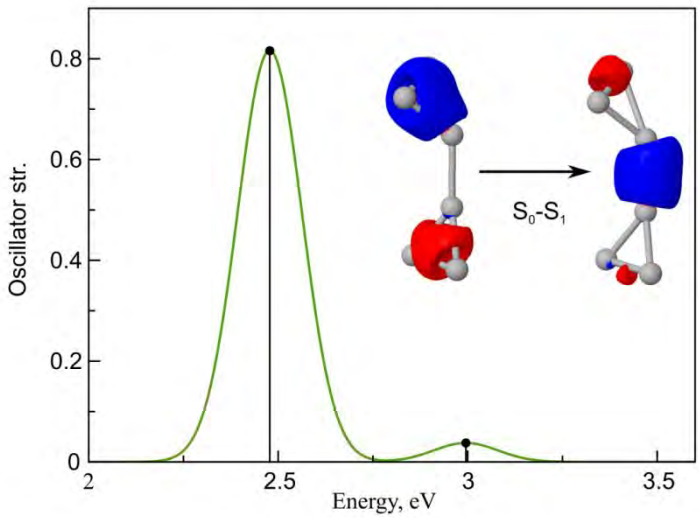


Fig. 5.3.7. Excitation spectrum of the isolated Ag_6^{+2} cluster. The lowest energy transition NTOs illustrated on the right [56].

5.4. Conclusions to Chapter 5.

Silver ions in complexes with DNA bind to cytosines, forming C-Ag^{+}-C pairs, which stabilize DNA duplexes. Luminescent silver clusters on DNA have an extended structure. The spectrum of free thread-like clusters strongly depends on the bending angles of the chain links. The extended cluster structure is stabilized by two parallel DNA strands. The results of QM/MM modeling of the complexes show that their chromophore centers consist of 3-6 silver atoms with a positive cluster charge. We obtained optimized structures of the Ag_3^{+1}, Ag_4^{+2}, Ag_6^{+2} clusters emitting in the blue, green, and red spectral regions. The cluster spectrum is influenced by interaction with nucleobases.

CHAPTER 6. DYNAMICS OF ELECTRON-EXCITED STATES IN DNA COMPLEXES WITH SILVER CLUSTERS

6.1. Formation of dark states in complexes.

Despite the fact that a significant number of different DNA-stabilized silver nanoclusters have already been synthesized, the dynamics of their excited states, in particular the dark state formation, has been little studied. Meanwhile, in last years, fluorophores with dark states have caused enhancing interest in fluorescence microscopy [257]. For example, the dark non-emitting states of Ag nanoclusters are proposed to be used in optically modulated fluorescence imaging [258]. There is still a problem in that the chemical yield of fluorescent clusters in a mixture does not exceed a few percent, despite the simple chemical synthesis. The obtained Ag cluster solutions are highly heterogeneous systems with multiple presence of non-fluorescence particles and required further purification to isolate fluorescent clusters. Most of investigations concerned unpurified solutions, which made it difficult to study the photophysical properties of the fluorescent clusters. As a result, most of the data on quantum yields and absorption cross-sections of the clusters presented in the literature are doubtful, since the fraction of the fluorescent clusters is not given.

In this section, we perform a method for direct measure of the absorption cross-section of the fluorescent clusters in a mixture of synthesized particles, as well as for determination of the rate constants for the dark state of the clusters. In this case, the method of the fluorescence saturation spectroscopy [167] was modified by using three different pulse excitation modes, in particular picosecond and nanosecond pulses, as well as CW (continuous wave) excitation [47, 48, 50]. We investigated Ag clusters emitting at a wavelength of about 620 nm on the 12-mer single-stranded DNA 5’-CCTCCTTCCTCC-3’ (DNA 1), discussed in the previous chapter, and on calf thymus DNA (CT DNA).

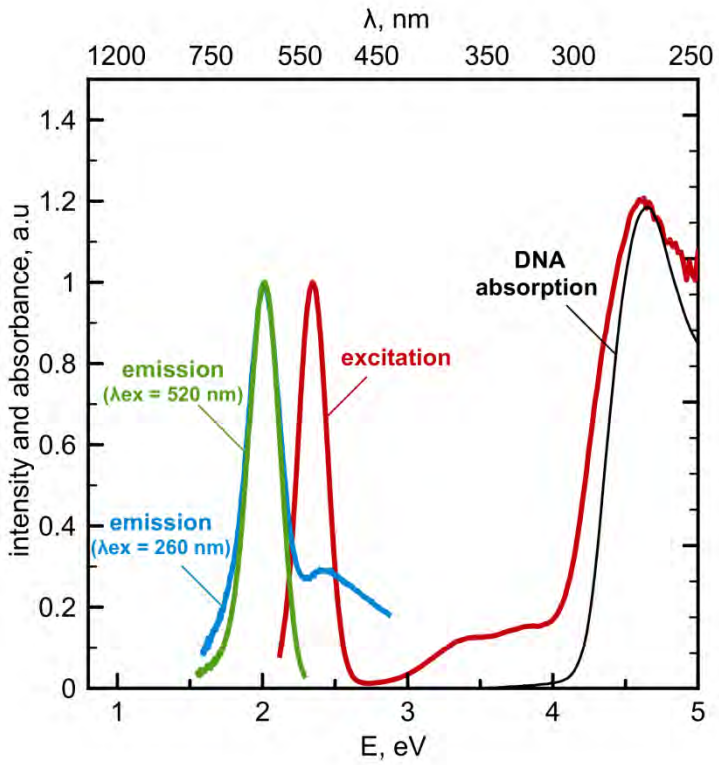


Fig. 6.1.1. Fluorescence excitation and emission spectra of the yellow-emitting Ag nanoclusters synthesized on the 12-mer DNA 5'-CCTCCTTCCTCC-3' [50].

Ag clusters synthesized at pH 5 on DNA 1 have basically one type of emitting clusters. Fig. 6.1.1 demonstrates the absorption, fluorescence, fluorescence excitation and excitation polarization spectra for clusters with the excitation/emission maxima at 529 nm/620 nm. They are just like the spectra at pH 6 in aqueous solution, shown above in Fig. 5.2.2A. The chemical yield of fluorescent clusters seems to be rather low, and most species are dark Ag clusters and nanoparticles, as can be seen from a comparison of the excitation and absorption spectra (Fig. 6.1.2). The weight of the red cluster in the total absorption remains uncertain even at 529 nm. However, the fluorescence spectra are practically independent of the excitation wavelength, indicating that one type of luminescent cluster is formed.

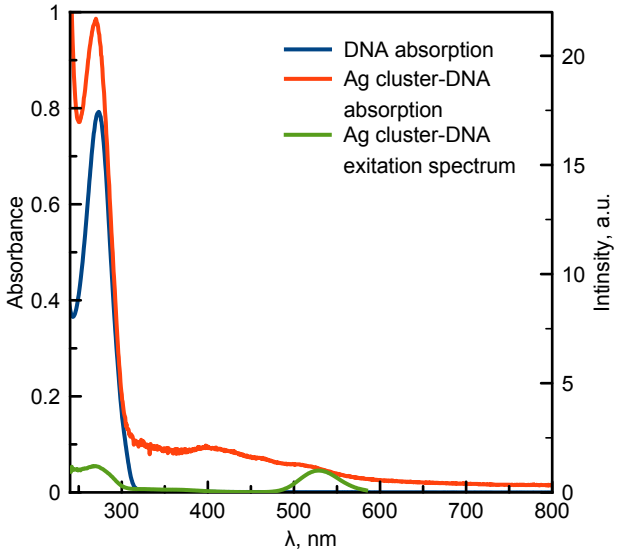


Fig. 6.1.2. Absorption spectra of S1 DNA strand and Ag cluster-DNA complexes after synthesis along with the corresponding excitation spectrum (emission at 620 nm). Even at 529 nm, the weight of the red-emitting cluster in the total absorbance is only about a few percent [50].

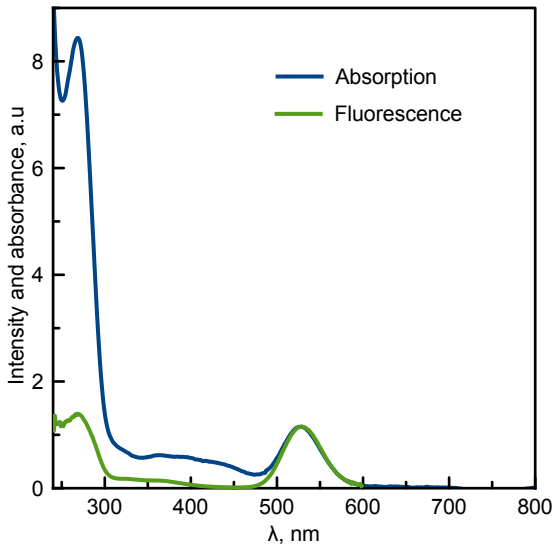


Fig. 6.1.4. Absorption and excitation (emission at 620 nm) spectra of the most enriched fraction of Ag cluster on S1 DNA strand obtained from HPLC purification as shown in Fig. 6.1.3 [50].

The unpurified cluster solutions have typically a large number of dark clusters. Unfortunately, the sample was unstable during the HPLC purification procedure commonly used for DNA-cluster complexes [132]. Fig. 6.1.3 presents a comparison of the excitation and absorption spectrum after purification. Further measurements by means of the fluorescence saturation method were carried out with unpurified solutions, since only one emitting cluster contributed to the fluorescence emission spectrum upon excitation at 530 nm. The fluorescence lifetime for the clusters was 2 ns. The same value was obtained by Richards et al. [247]. Fig. 6.1.4 shows the scheme of photophysical processes including three electronic states of the Ag cluster.

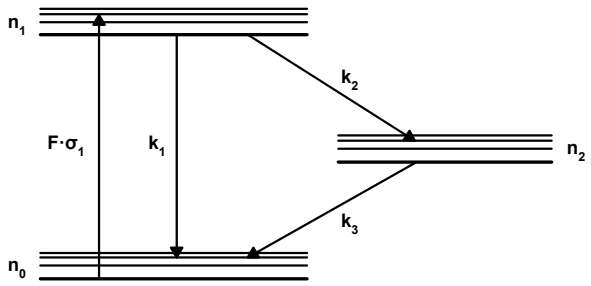


Fig. 6.1.4. The scheme of photoprocesses used in our model for a fluorescence cluster [50].

The excitation and deactivation of the first singlet state, as well as the formation and deactivation of a dark state, are included in the three-level model of photoprocesses in the Ag clusters. It can be expressed using a series of the following kinetic equations for a dilute solution:

$$\frac{dn_0(t)}{dt} = -F(t)\sigma_1 n_0(t) + k_1 n_1(t) + k_3 n_2(t)$$

$$\frac{dn_1(t)}{dt} = F(t)\sigma_1 n_0(t) - k_1 n_1(t) - k_2 n_1(t)$$

$$\frac{dn_2(t)}{dt} = k_2 n_1(t) - k_3 n_2(t)$$

$$c = n_0 + n_1 + n_2 \qquad (1).$$

Here n_0, n_1, and n_2 are the cluster concentrations in the ground, first singlet, and dark states; c is the total concentration of the clusters; F is the excitation photon flux; σ_1 is the absorption cross-section; k_1 is the singlet deactivation rate; $k_1+k_2 = \tau^{-1}$, where τ is the fluorescence lifetime and k_2 is the rate of the transition from the singlet state to the dark state; k_3 is the rate of deactivation of the dark state. The repopulation of the ground state from the dark state can be neglected under nanosecond and picosecond excitation, since the expected lifetime of the dark states of the Ag clusters would be about 10 microseconds [259].

In the case of picosecond pulse excitation, when the pulse width is $t_p \ll \tau$, equations (1) are simplified to:

$$\frac{dn_0(t)}{dt} = -F(t)\sigma_1 n_0(t)$$

$$c = n_0 + n_1 \qquad (2).$$

This system can be solved analytically. Integration of the differential equation gives:

$$ln\frac{n_0(t_p)}{n_0(0)} = -\int_0^{t_p} F(t)\sigma_1\, dt = -\frac{\sigma_1 E}{shv},$$

where $E = hvs\int_0^{t_p} F(t)\, dt$ is the pulse energy, s is the beam area, h is the Planck constant, and v is the frequency of light.

Since $n_0(0) = c$, we get:

$$n_1 = c(1 - e^{-\frac{\sigma_1 E}{shv}}) \qquad (3),$$

The fluorescence intensity is proportional to n_1 and can be obtained as:

$$I_{fl} = A(1 - e^{-\frac{\sigma_1 E}{shv}}) \qquad (4),$$

where A is the product of the instrument factor and the quantum yield of fluorescence.

Reference measurements of absorption cross-section were made for rhodamine (Rhod 6G) solution. Pulse energy dependences of the fluorescence response obtained for Rhod 6G and Ag clusters are shown in Fig. 6.1.5.

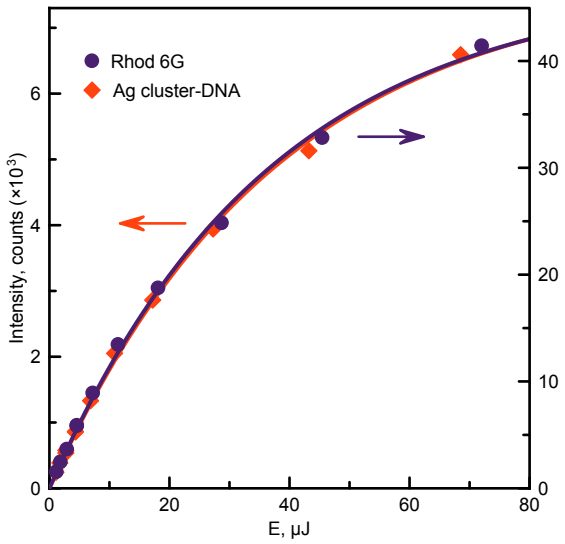


Fig. 6.1.5. Pulse energy dependence of integral fluorescence intensities for Rhod 6G (λ_{em} = 540 – 600 nm) and Ag clusters (λ_{em} = 580 – 620 nm) at picosecond pulse excitation [50].

A value of $(4.1\pm0.4)\cdot10^{-16}$ cm^2 for the absorption cross-section of Rhod 6G, which coincides with the reference value [260], was obtained by the data approximation by Eq. (4). For Ag cluster, saturation curve practically coincides with the curve obtained for Rhod 6G, which suggests a close value of the absorption cross-section. The data approximation for the cluster gives the value of $(3.5\pm0.3)\cdot10^{-16}$ cm^2 or $(0.90\pm0.08)\cdot10^4$ M^{-1}·cm^{-1}. In contrast, the value obtained for the same cluster using the fluorescence correlation spectroscopy (FCS) is $(1.2\pm0.3)\cdot10^4$ M^{-1}·cm^{-1} [247], which is 30% higher than the value obtained by our method. It should be noted that an absolute concentration of the fluorescent clusters is given by FCS. In order to calculate the absorption coefficient of fluorescent clusters, it is necessary to know their relative contribution to the absorption in a complex mixture of emitting and non-emitting clusters and particles. If the relative weight of the fluorescent clusters in the total absorption is rather low, this can lead to an overestimation of the absorption cross-section in the FCS method. In this

regard, the only direct method for evaluation of absorption of the fluorescent clusters is the fluorescence saturation spectroscopy.

The numerical solution of Eq. (1) allows one to obtain the rate constant for the formation of the dark non-fluorescent state in the case of nanosecond pulse, when the pulse width is comparable to the lifetime of the singlet excited state. Fig. 6.1.6 illustrates the saturation curves of the fluorescence response for the Rhod 6G and Ag cluster. As can be seen, the curves for the dye and the cluster in this case are different, unlike the case of the picosecond pulse excitation. This difference indicates a relatively high efficiency of the formation of the dark state of the Ag cluster in comparison to the dye, for which the formation rate of the dark triplet state is rather low (~10^6 s^{-1} [261, 262]).

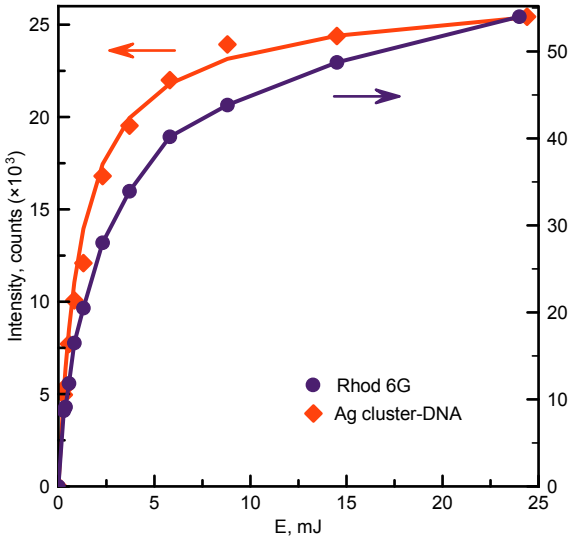


Fig. 6.1.6. Fluorescence response for Rhod 6G and Ag clusters at nanosecond pulse excitation. The data for Ag clusters were fitted numerically using three-level model (1). The rhodamine data are connected by straight lines for comparison with the cluster [50].

The value of k_2=(0.9±0.1)·10^8 s^{-1} was obtained by numerical solution of Eq. (1). The efficiency value of the dark state formation was 17±3%. It was assumed that the result of photoinduced electron transfer from the cluster to DNA are the dark states in DNA-based Ag clusters [164]. For near-IR emitting Ag clusters, the yield of the dark state was several percent [164]. The structure of Ag clusters, probably, determines the yield

of the dark state, presumably by the number of silver atoms and the cluster charge, which can noticeably change the redox properties of the clusters.

We estimated the rate of the dark state deactivation, using the CW excitation mode. In this case, the equilibrium concentrations are determined by the following system of linear equations:

$$F\sigma_1 n_0 = n_1 k_1 + n_2 k_3$$

$$n_1 k_2 = n_2 k_3$$

$$c = n_0 + n_1 + n_2 \qquad (5).$$

Solving this system, we get n_1 as:

$$n_1 = c \cdot \frac{F\sigma_1}{F\sigma_1\left(1+{}^{k_2}/_{k_3}\right)+k_1+k_2} \qquad (6),$$

and finally the fluorescence intensity (I_{fl}) can be expressed as:

$$I_{fl} = a \cdot \frac{{}^{\sigma I_{ex}}/_{h\nu}}{{}^{\sigma I_{ex}}/_{h\nu}\left(1+{}^{k_2}/_{k_3}\right)+1/\tau} \qquad (7),$$

where a is a constant proportional to concentration and radiative rate, I_{ex} is the excitation intensity.

Fig. 6.1.7 demonstrates the saturation curves obtained for Rhod 6G and Ag clusters under CW excitation. The linear plot for Rhod 6G is consistent with a rather low yield of the triplet state [261, 262]. A relatively high rate of the dark state formation explains the small deviation of the curve for the Ag cluster from the Rhod 6G plot. Unfortunately, the low signal allowed us to estimate the k_3 rate only approximately with an error of 50%. The data approximation by expression (7) to gives the value of k_3=10 μs^{-1}. The rate constants of photoprocesses obtained for the red Ag cluster on DNA1 are shown in Table 6.1.1.

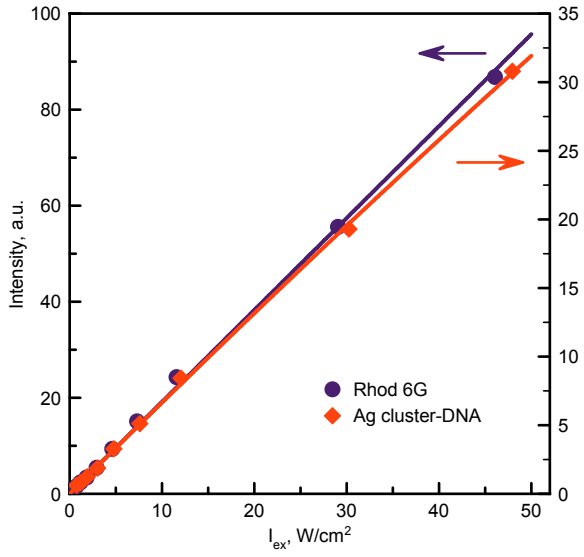


Fig. 6.1.7. Dependence of the fluorescence responce of Rhod 6G and Ag clusters on the intensity of CW excitation. The initial slopes of the curves coincide [50].

Table 6.1.1. Photophysical constants of the red-emitting Ag nanoclusters on DNA 1 oligonucleotide [50].

σ_1, 10^{-16} cm^2	k_1, 10^8 s^{-1}	k_2, 10^6 s^{-1}	k_3, 10^6 s^{-1}
3.5±0.3[a]	4.2±0.1[b]	85±10[c]	0.1±0.05[d]

[a] – the absorption cross-section at 530 nm; [b] – the rate of the excited singlet deactivation; c – the rate of the dark state formation; [d] – the rate of the dark state deactivation.

Fluorescence emission and excitation spectra of the yellow-emitting clusters on CT DNA with the excitation/emission maxima at 510 nm/590 nm are shown in Fig. 6.1.8. Fluorescence lifetime for the clusters was estimated to be 2.4 ns [47]. The spectral properties of Ag clusters on CT DNA are similar to the clusters on DNA 1. Saturation curves of fluorescence intensities for Rhod 6G and Ag-DNA clusters are shown in Fig. 6.1.9.

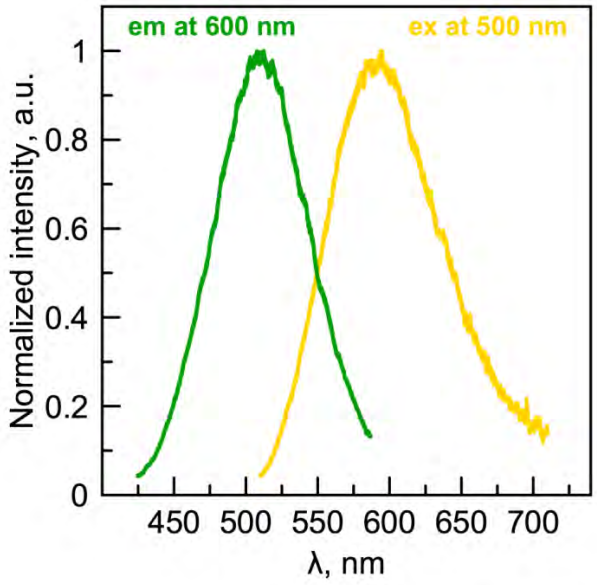


Fig. 6.1.8. Fluorescence excitation and emission spectra of the yellow-emitting Ag nanoclusters synthesized on CT DNA. Emission and excitation wavelengths are shown on the top [47].

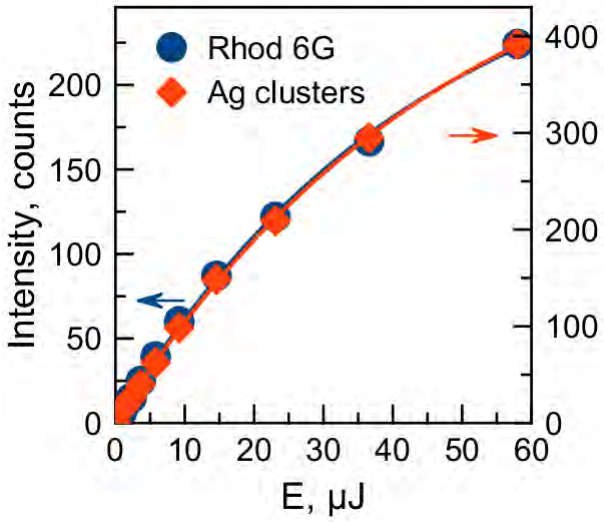


Fig. 6.1.9. Pulse energy dependence of the fluorescence intensities for the Rhod 6G and Ag clusters at 553 nm and 600 nm, respectively. Excitation was made by picosecond pulses at 530 nm at frequency 10 Hz. The data are fitted by Eq. (4) [47].

For the nanosecond pulse regime, the pulse energy dependences of the fluorescence intensities for Rhod 6G and Ag cluster are shown in Fig. 6.1.10.

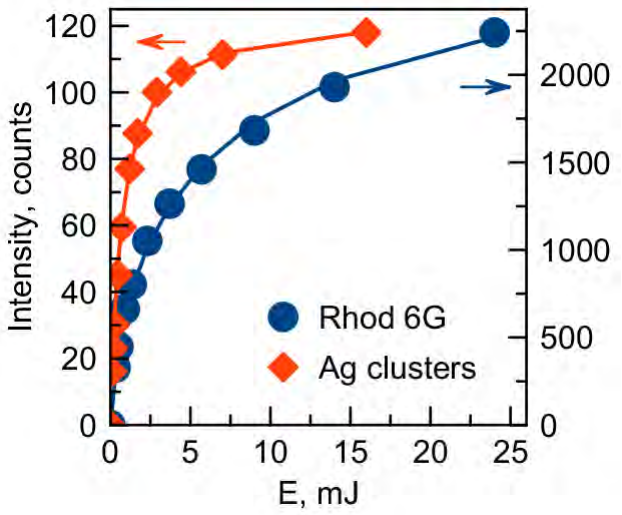


Fig. 6.1.10. Pulse energy dependence of the fluorescence intensities for the Rhod 6G and Ag clusters. Excitation was made by nanosecond pulses at 532 nm [47].

Fig. 6.1.11 shows the saturation curves obtained for both Rhod 6G and Ag-DNA nanoclusters in the case of CW excitation. A fit of the curve by the expression (5) gives the value of the dark state lifetime of 15 ± 5 μs that appears to be close to the values observed earlier for the cluster on DNA 1. Photophysical parameters of Ag clusters on CT DNA are shown in Table. 6.1.2.

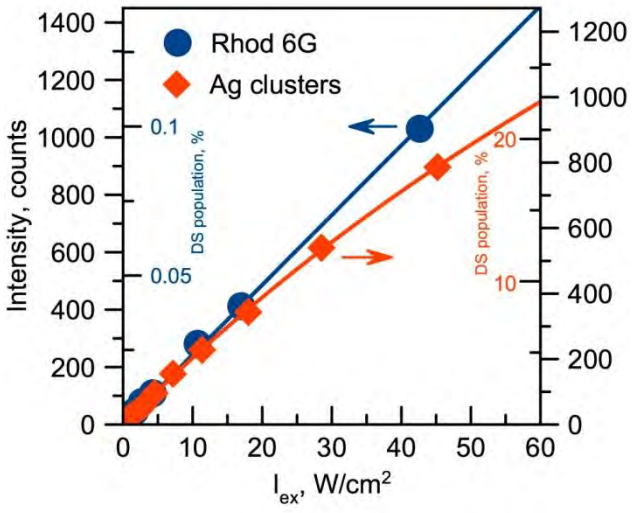


Fig. 6.1.11. Excitation intensity dependence of the integral fluorescence intensities and the dark state populations for the Rhod 6G and Ag clusters under CW excitation The curves are scaled so that their initial slopes coincide [47].

Table 6.1.2. Photophysical constants of Rhod 6G and yellow-emitting Ag nanoclusters on CT DNA [47].

	σ_1, 10^{-16} cm^2	σ_2, 10^{-16} cm^2	k_1, 10^8 s^{-1}	k_2, 10^{12} s^{-1}	k_3, 10^6 s^{-1}	k_b, 10^{10} s^{-1}	k_5, 10^6 s^{-1}
Rhod 6G	4.43[a]	2.08[b]	2.53[c]	5[d]	2.5±0.5[e]	1.0±0.2[f]	0.49[g]
Ag-DNA	3.8±0.2[h]		3.2±0.1[i]		100±10[j]		0.06±0.02[k]

[a, b] – the absorption cross-sections for the ground and the first singlet states of Rhod 6G at 532 nm and 530 nm, respectively, taken from [260, 264]; [c] – the rate constant for deactivation of the first singlet into the ground state of Rhod 6G, calculated from the known values of the singlet lifetime of 3.9 ns [265] and the obtained value of k_3; [d] – the rate constant for internal conversion from the higher singlet state of Rhod 6G taken from [266]; [e] – the rate constant for intersystem crossing from the first singlet of Rhod 6G, determined from the nanosecond-pulse excitation; [f] – the rate of photobleaching from the higher singlet state of Rhod 6G, determined from the nanosecond-pulse excitation. Intersystem crossing in the higher state is considered to be negligible [266]; [g] – the rate constant for the dark state deactivation for Rhod 6G taken from [265]; [h] – the absorption cross-section for the ground state of the clusters, determined from the picosecond-pulse excitation at 530 nm; [i] – the rate constant for deactivation of the first singlet into the ground state of the clusters, determined from the nanosecond-pulse excitation using the value of the singlet lifetime of 2.4 ns; [j] – the rate constant for the dark state formation from the first singlet of the clusters, determined from the nanosecond-pulse excitation; [k] – the rate constant of dark state de-excitation for the clusters determined from CW excitation.

For the clusters on the 15-mer DNA duplex, the structure of which was considered in the previous chapter, we also determined the extinction coefficient of the cluster using the same saturation method. The fluorescence saturation curve is shown in Fig. 6.1.12. A fit of the curve by Eq. (4) gives the value of the extinction coefficient $\varepsilon_{490}=(2.0\pm0.4)\cdot10^5\ M^{-1}\cdot cm^{-1}$.

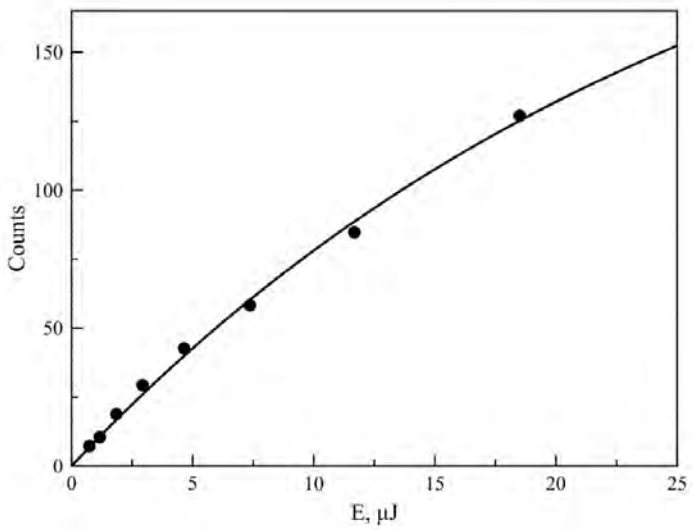


Fig. 6.1.12. Pulse energy dependence of integral fluorescence intensity of Ag clusters on the 15-mer DNA (λ_{em}=580–620 nm), excitation at 485 nm [56].

6.2. Energy transfer in DNA complexes with silver clusters.

In this part of the work, the problems of determining the radius and rate of electronic excitation energy transfer between DNA bases and silver clusters were solved. The migration radius was determined by the ratio of the intensities of the UV DNA excitation band with a maximum of 260 nm and the cluster excitation band in the visible region, using the approach considered in Chapter 4. The rate of excitation transfer was estimated by the kinetics of fluorescence of DNA and acceptor in the femtosecond time range. Based on these data, it was concluded that the exciton mechanism of energy transfer in DNA complexes with silver nanoclusters takes place. The possibility of delocalization of the excitation energy (coherent exciton) in a system of weakly interacting chromophores was shown earlier in our works by the example of intercalating dye molecules of acridine orange [88, 98].

Fig. 6.2.1 shows the fluorescence emission and excitation spectra of Ag clusters on the 12-mer DNA 5'-CCTCCTTCCTCC-3'. We have also plotted the absorption spectrum of the DNA matrix, using the extinction coefficients of the cluster, defined in Section 6.1, and the DNA template [267]. The fluorescence excitation spectrum reveals two strong transitions at 528 nm and 270 nm. The band with a maximum at 528 nm evidently comes from the lowest energy transition of the Ag-DNA complex. The excitation band with a maximum at 270 nm nearly coincides with the DNA absorption spectrum. This means that about 12 DNA bases transfer the excitation energy to the cluster. This value appears to be similar to that was estimated earlier for a 23-mer DNA hairpin with 14 bases in the stem [117].

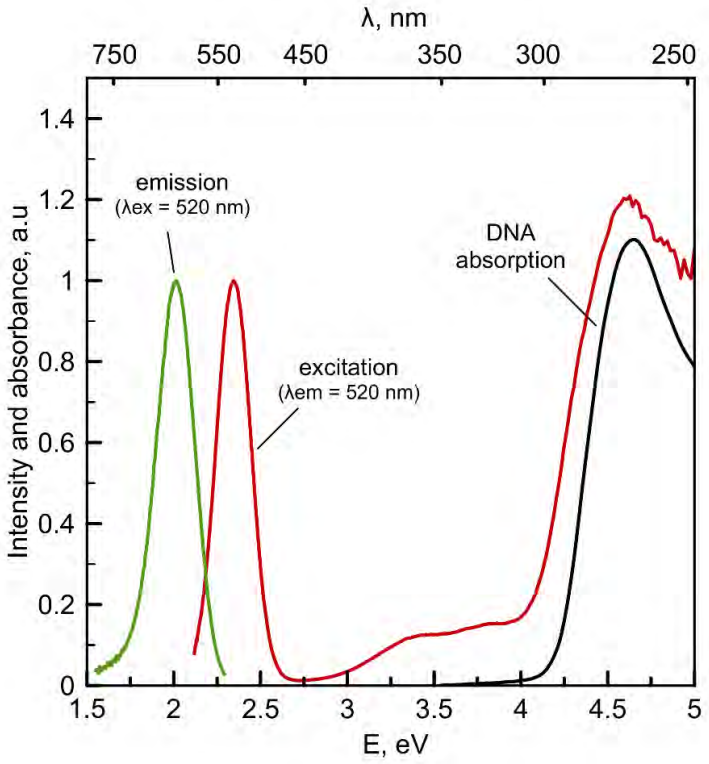


Fig. 6.2.1. Fluorescence emission and excitation spectra of the Ag cluster on the 12 mer DNA; absorption spectrum of the DNA matrix (the excitation spectrum of the complex and absorption spectrum of the DNA matrix are scaled to the same units using the known extinction coefficients of the cluster [50] and the 12-mer DNA) [267].

One can argue that the number of bases collecting the excitation energy, N=12, can be largely overestimated due to the intrinsic absorption of the cluster. If this were so, an increase in the DNA length and/or the length of the double-stranded region should have a little effect on N. To verify this, we synthesized Ag fluorescent clusters with similar spectral and, therefore, structural properties on natural CT DNA and also on a 15-mer DNA duplex [46, 53, 56]. The synthesis of DNA-stabilized Ag clusters usually leads to a heterogeneous solution containing several types of nanostructures, most of which are the non-luminescent Ag–DNA complexes and bare DNA strands [51, 132]. In some cases, homogeneous solutions of the Ag–DNA fluorescent complexes with a specific cluster DNA stoichiometry can be obtained using high-performance liquid chromatography (HPLC) [132]. We performed this purification for a cluster on the 15-mer DNA. Fig. 6.2.2 shows the absorption, fluorescence and excitation spectra of the HPLC-purified complex of the 15-mer DNA (5′-CGCCCCCCTCGGCGT-3′) and the Ag clusters emitting at 560 nm. The absorption coefficient of the cluster at 485 nm was obtained directly by the fluorescence saturation method, described in the previous Section 6.1. It was shown that two DNA strands stabilize the cluster (therefore, cluster:DNA stoichiometry is equal to 1:2) [132]. Fig. 6.2.2 also shows the absorption spectrum of a DNA duplex with an extinction coefficient calculated using an oligocalculator [267]. As can be seen form the figure, the UV band of the complex at 260 nm belongs majorly to DNA, while the band with a maximum at 485 nm is obviously the lowest energy transition of the Ag cluster. The UV band observed in the excitation spectrum of the complex, as in other Ag–DNA complexes, is probably associated with energy transfer between the DNA and the Ag cluster. The excitation spectrum approaches the absorption spectrum, which points out that the energy transfer efficiency is close to unity. Quantitatively, the transfer efficiency φ can be estimated from the spectra shown in Fig. 6.2.2, as follows (see Chapter 4):

$$\varphi = 1 - \frac{A(\lambda) - I(\lambda)}{A_{DNA}(\lambda)} \qquad (1).$$

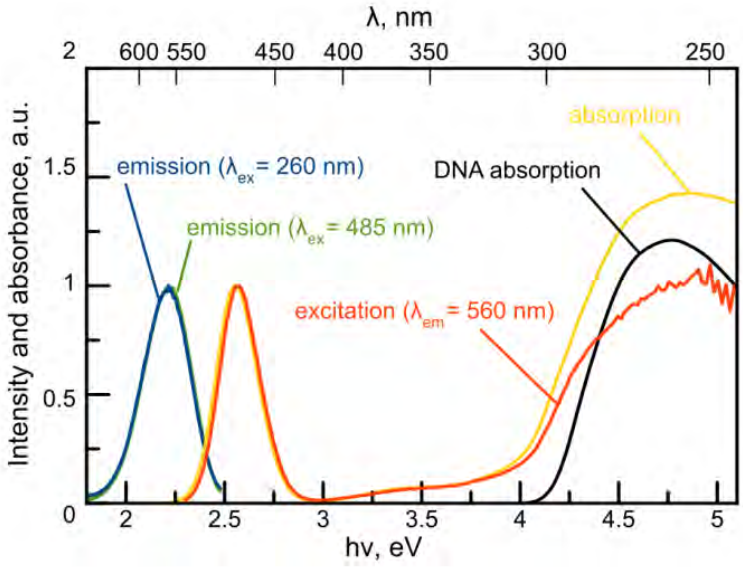


Fig. 6.2.2. Fluorescence emission (blue and green), excitation (red), and absorption (yellow) spectra of HPLC-purified Ag–15-mer DNA (5'-CGCCCCCCTCGGCGT-3') complex; the absorption spectrum of the DNA dimer template is in black. The excitation and absorption spectra of the DNA-Ag cluster complex are normalized to 1 at visible maximum. The DNA absorption spectrum is plotted as the ratio of DNA extinction coefficient to the cluster extinction coefficient at visible maximum [56].

In this equation, the absorption $A(\lambda)$ and the fluorescence excitation $I(\lambda)$ spectra of the Ag–DNA complex are normalized to unity at the maximum in the visible part of the spectrum. The DNA absorption spectrum A_{DNA} (λ) is calculated as the ratio of DNA extinction coefficient $(\varepsilon_{DNA}(\lambda))$ to the extinction coefficient of a cluster at a visible maximum (ε_{Ag}^{max}). From the obtained spectral data, we get the transfer efficiency $\varphi = 0.70 \pm 0.05$, which means that 21 ± 2 DNA bases (out of 30 in the complex) transfer energy to the cluster with 100% efficiency. Otherwise, it can be interpreted as if the entire DNA duplex was as an antenna with an efficiency of 70%. In our simple model, we neglected interaction of the bases and the cluster, which can influence on the DNA extinction coefficient. Though, given the small size of the cluster compared to the DNA length (as shown below), we do not expect that it qualitatively changes the effect. The complex QM calculations require a thorough study of the electronic states of the Ag–DNA complex.

We synthesized fluorescent clusters on CT DNA and applied a similar technique to define the number of bases that transfer energy to the clusters, in order to assess the possible length of the light-harvesting region in natural DNA. As a rule, the chemical yield of luminescent clusters on double-stranded DNA is small [46, 152]. Thus, the native CT DNA was first subjected to thermal denaturation, which also allowed us to obtain a more homogeneous solution of fluorescent clusters. Fig. 6.2.3 illustrates the fluorescence and excitation spectra of the Ag clusters on the CT DNA matrix. The emission spectrum of the DNA-cluster complex has an emission band of about 580 nm with excitation of 260 nm and 490 nm. The emission spectrum excited in the DNA band also shows a small presence of two other clusters in the blue and red regions that dominated the earlier and later stages of synthesis, respectively (the spectrum excited at 260 nm is divided into three bands, as shown in Fig. 6.2.3).

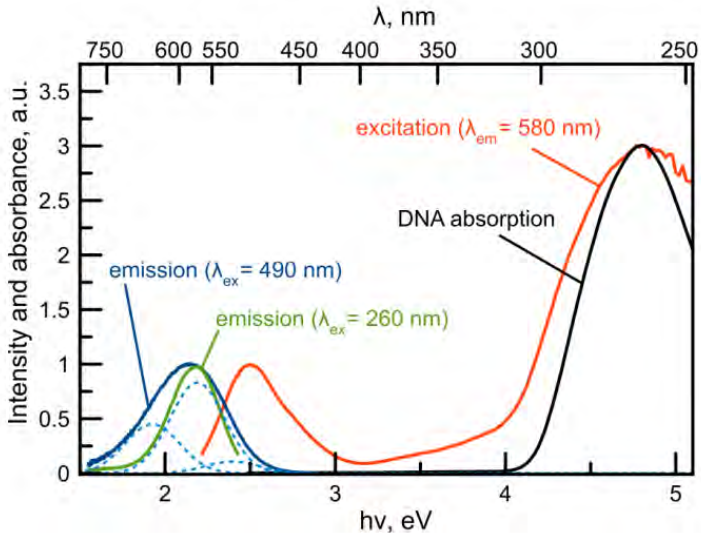


Fig. 6.2.3. Fluorescence emission (blue and green), and excitation (red) spectra of Ag clusters bound to CT DNA; the absorption spectrum of the DNA template (scaled to the maximum of the UV excitation band) is in black. The emission spectrum of the complex excited at 260 nm (blue) was resolved into three Gaussians (dashed) [56].

The fluorescence excitation band with a maximum at 260 nm practically coincides with the DNA absorption spectrum, which indicates that there is an energy transfer from the DNA bases to the cluster. As in the case of the Ag cluster on the 15-mer DNA, the

intrinsic absorption of the cluster at 260 nm is likely to be negligible compared with the absorption of DNA bases acting as sensitizer of the Ag cluster emission. If that is true, then the number of DNA bases transferring energy *N* can be estimated from the UV and visible band intensity ratio in the fluorescence excitation spectrum of the cluster by the following equation (see Chapter 4):

$$N = \frac{I(260)\cdot f\cdot \varepsilon_{Ag}^{max}}{\varepsilon_{DNA\ b.}(260)\cdot \varphi} \qquad (2),$$

where $I(260)$ is the intensity at 260 nm in the excitation spectrum, normalized to 1 at the visible maximum, f is the cluster contribution to the intensity at the emission maximum at 490 nm, $\varepsilon_{DNA\ b.}(260)$ is the extinction coefficient of DNA bases at 260 nm, and φ is the transfer efficiency.

In the previous section we obtained the value $\varepsilon_{Ag}^{max} = (1.0 \pm 0.1)\cdot 10^5$ M^{-1} cm^{-1} at 490 nm. We obtained *N*=35±3 bases, assuming a typical value of $\varepsilon_{DNA\ b.}(260) = 6.6\cdot 10^3$ M^{-1} cm^{-1} for CT DNA, f = 0.8, found from the three-Gaussian approximation (Fig. 6.2.3), and based on 100% transfer efficiency. This value is apparently slightly overestimated as a result of the contribution of the intrinsic absorption of the cluster to the excitation spectrum of the complex. If this contribution, as in the case of the 15-mer DNA, is about 20%, it reduces *N* to 28 bases. It should also be noted that if the transfer efficiency is less than 100%, the value of *N* would be even higher.

We evaluated the possible rate of the energy transfer by carrying out a series of measurements of the fluorescence kinetics, to clarify the mechanism of energy transfer in the complexes of DNA cluster. Firstly, we measured the fluorescence lifetime of the bare CT DNA and the 15-mer oligonucleotide used to synthesize the Ag–DNA fluorescent complexes. Fig. 6.2.4 shows the fluorescence decay curve of the 15-mer DNA at 325 nm in a time range of 5 ps. The main component of the fluorescence lifetime of 380 fs is given by the approximation by two exponents. The excited state of the main fraction of CT DNA deactivated during 490 fs (Fig. 6.2.5). The low concentration of the Ag-DNA fluorescent complexes in solution and strong

photobleaching of the clusters impede the direct measurement of the energy transfer rate in the case of the green cluster on the 15-mer. Though, the possible transfer rate can be estimated from the DNA fluorescence lifetime. The high efficiency of energy transfer between donor and the acceptor implies a relatively high rate of transfer compared to the donor lifetime in an excited state. The energy transfer efficiency is defined as follows [168]:

$$\varphi = \frac{k_{ET}}{k_{ET}+k} \qquad (3),$$

where k_{ET} is the energy transfer rate and k is the intrinsic rate of donor deactivation. It follows that the transfer should occur within <160 fs, at the given deactivation rate of DNA of $(380\ \text{fs})^{-1}$ and φ=0.7 for the 15-mer DNA.

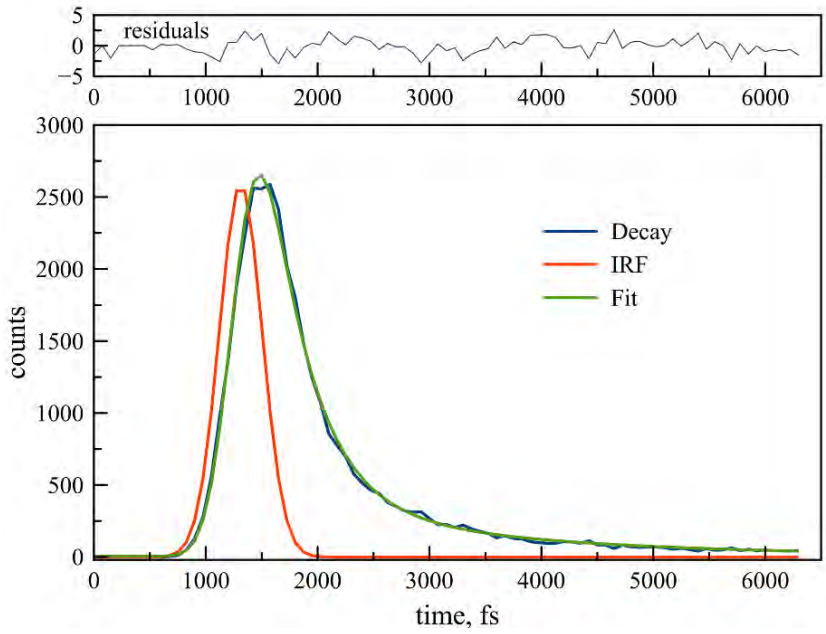


Fig. 6.2.4. Fluorescence decay curve of 5'-CGCCCCCCTCGGCGT-3' DNA at 325 nm (λ_{ex} = 266 nm); fit: 0.91exp(-t/380 fs) + 0.09exp(-t/2 ps) [56].

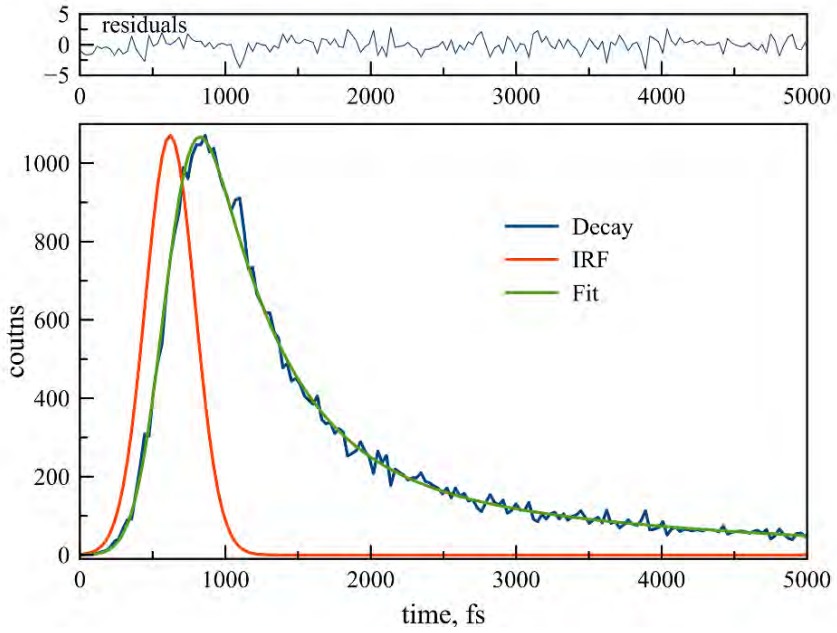


Fig. 6.2.5. Fluorescence decay curve of CT ssDNA at 330 nm (λ_{ex} = 266 nm); fit: 0.85exp(-t/490 fs) + 0.15exp(-t/2.6 ps) [56].

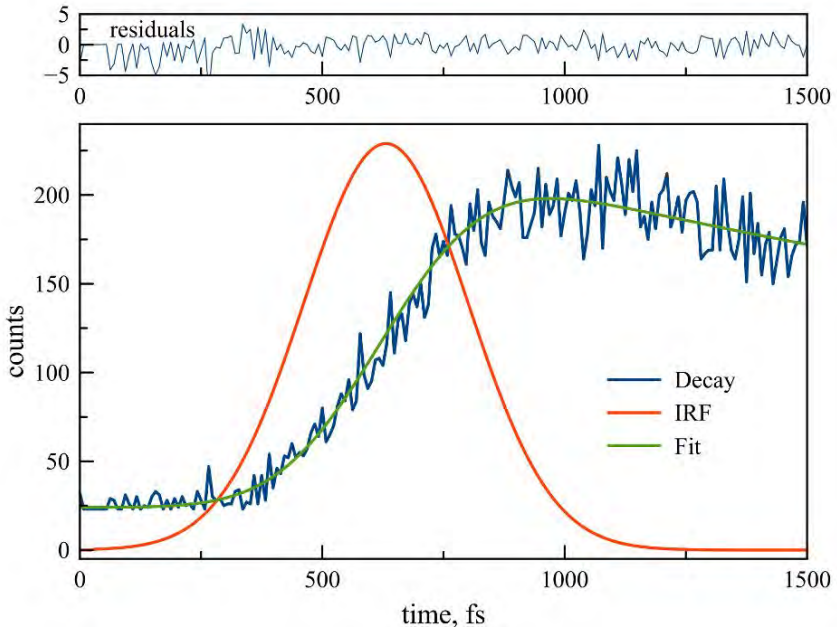


Fig. 6.2.6. Fluorescent decay curve of Ag clusters bound to CT ssDNA at 590 nm (λ_{ex} = 266 nm); fit: exp(-t/3 ps) [56].

The rate of the energy transfer from DNA to a cluster can be directly measured as the rise time of the cluster fluorescence upon the DNA excitation. The fluorescence growth curve of the cluster on CT DNA with an excitation of 266 nm (within the DNA absorption band) is presented in Fig. 6.2.6. Based on the time resolution of the instrument of approximately 100 fs, it can be argued that the energy transfer does occur in a time less than <100 fs.

To draw conclusions about the possible mechanism of energy transfer in the studied systems, it is necessary to know the distance between the donor and the acceptor. For this, we turn to the structures of complexes that were obtained in the previous chapter. In a complex 12-mer DNA-Ag cluster, the Ag_4^{+2} cluster is stabilized by two C-C and one T-T mismatch pairs in the stem of the DNA hairpin.

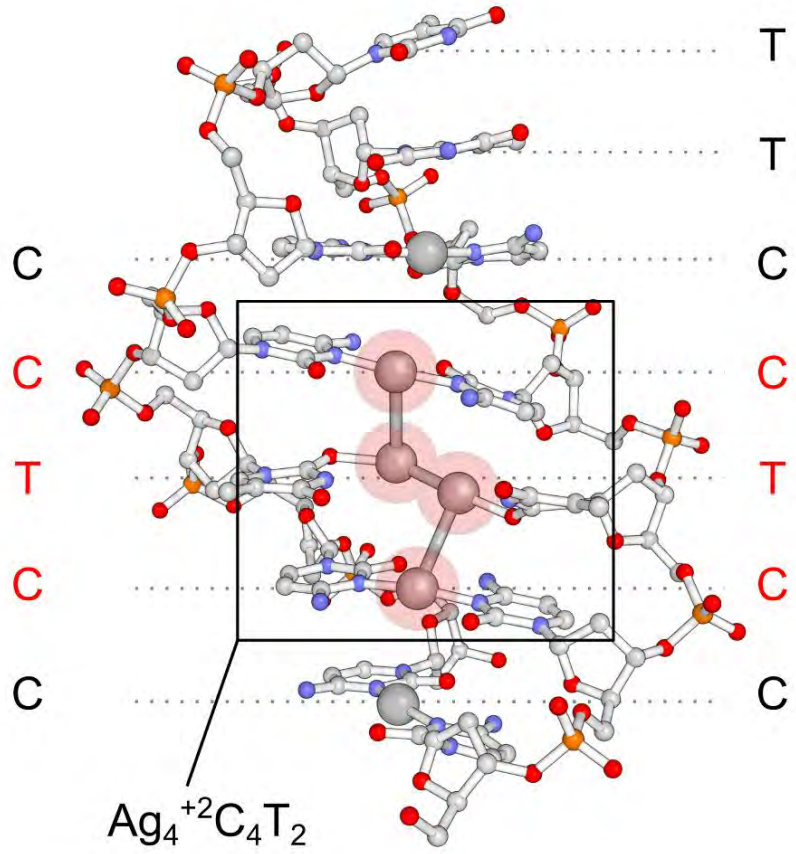


Fig. 6.2.7. Structure of the fluorescent complex of Ag_4^{+2} cluster with the 12-mer 5'-CCTCCTTCCTCC-3' [56].

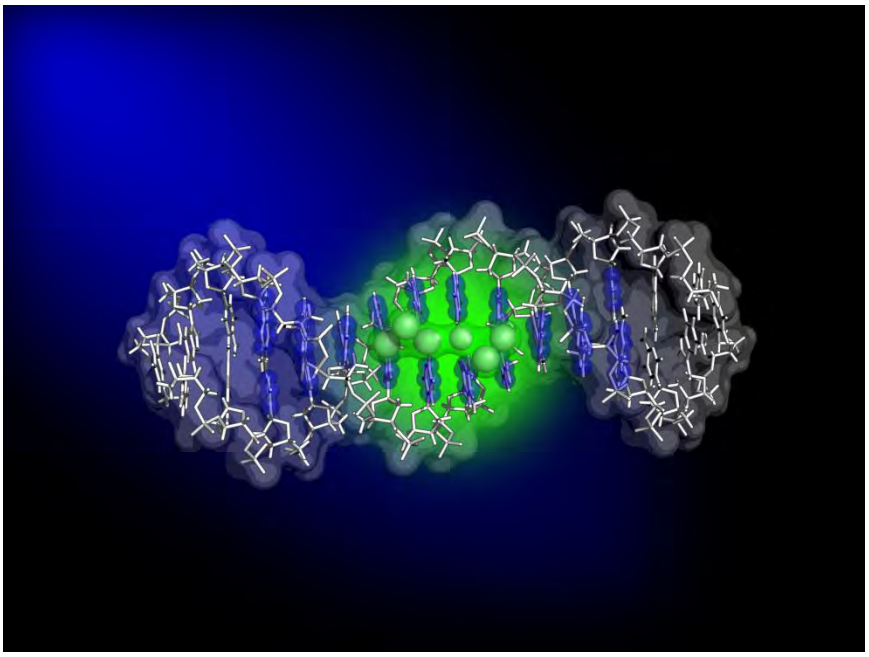


Fig. 6.2.8. Structure of Ag_6^{+2} cluster on the 15-mer DNA duplex [56].

The structure of the complex is shown in Fig. 6.2.7. The clusters on the 12-mer DNA and CT ssDNA exhibit similar excitation/emission spectra and the same absorption cross sections. This suggests a similar structure of the fluorescent Ag-DNA complexes. The structure of Ag cluster on the 15-mer DNA duplex was discussed in Chapter 5. The chromophore center of the complex consists of 6 silver atoms extended in a zigzag line and stabilized by two DNA strands (Fig. 6.2.8). The cluster has a charge of +2.

The number of bases collecting the excitation energy in complexes of the Ag clusters with CT DNA and a 15-mer DNA duplex is 5-7 times larger than the characteristic values observed for the DNA-acceptor systems [12, 112, 241, 115, 116] and is three times larger than expected previously for a 23-mer [117] hairpin with about 10 bases in the stem. The clusters bind to 6-8 DNA bases in double-stranded regions (Fig. 6.2.7 and 6.2.8). The excited states of the complexes, as shown in the previous chapter, involve orbitals of Ag atoms and the DNA bases. In fact, the "cluster" is a metalloorganic complex with extended excited states involving 6-8 DNA bases and 4-6 silver atoms (Ag_4B_6 or Ag_6B_8). Thus, one can expect an energy transfer from 6-8 DNA bases in the Ag_4B_6 and Ag_6B_8 chromophoric cores. However, in relatively long double-stranded regions (as in CT DNA or the 15-mer duplex), 21–28 bases are nvolved in

energy transfer as donors, most of which are distant from the cluster. Consequently, the energy transport through the DNA helix contributes significantly to the energy transfer. The high transfer rate of $\gtrsim (100\ \text{fs})^{-1}$ at a distance of about 25 Å (half the length of the 15-mer duplex) is obviously incompatible with the trivial incoherent Förster mechanism. Delocalization of the excitation between DNA bases not bound to Ag atoms and at least one base bound to the cluster is necessary for this ultrafast (and, therefore, highly efficient) energy transfer. In this case, the excited states of the system $|k\rangle$ are mixed states and can be written as a sum of the excited states of nucleobases $\Psi_{k,i}$ and the acceptor (Ag_4B_6 or Ag_6B_8) Ψ_A:

$$|k\rangle = \sum C_{k,i}\,\Psi_{k,i} + C_A\,\Psi_A \qquad (4).$$

The degree of delocalization of the excitation, i.e., the number of coherently coupled chromophores, is commonly quantified by the inverse participation ratio [34] $IPR=1/L_k$:

$$L_{k=} \sum_i \left[\sum_m (C_{k,i}^m)^2\right]^2 \qquad (5),$$

where m represents the different electronic states of chromophor i. Theoretical calculations, accounting for conformational disorder in polynucleotides, predicted an *IPR* value of 6-8 bases [69, 270]. In the simplest case of a two-state system isolated from environment, the excitation oscillates between chromophores with the frequency $V/\hbar$, where V is the interaction energy calculated as the matrix element $\langle \Psi_1 | \hat{V} | \Psi_2 \rangle$. In reality, calculations of the complicated dynamics of the system of interacting chromophores should consider energetic and conformational disorder and all relevant vibronic states, including system-bath interactions. Various theoretical approaches to the excitation dynamics can be found in the literature [2, 59, 61-64].

In our case, it is most probable that excitation is delocalized at the DNA bases in one strand. Then, to collect the excitation energy from DNA bases that are not bound with the cluster, the minimum required size of exciton (M) in each of the four single-strand DNA segments adjacent to the cluster can be estimated as:

$$M = \frac{N-n}{4} + 1 \qquad (6),$$

where N is the number of bases that transfer energy, and n is the number of bases bound with Ag clusters. In the case of the 15-mer DNA duplex, N=21 and n=8. M thus estimated appears to be four bases. For CT DNA, N=28 and n=6, and M is about seven bases. Fig. 6.2.9 schematically shows this case.

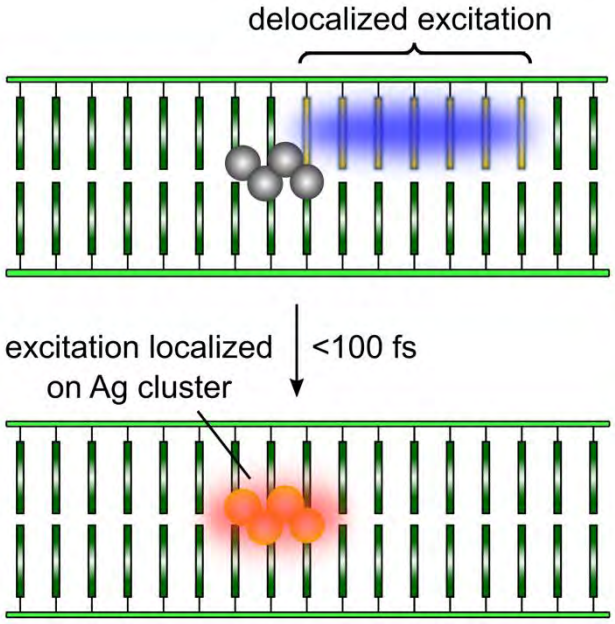


Fig. 6.2.9. The excitation transfer between DNA bases and the emitting DNA duplex–bound Ag cluster. Vertical bars represent DNA bases in the duplex, grey circles represent the cluster bound with six bases, the blue oval area shows the spatial extent of the exciton, and the red oval area illustrates localization of the excitation on the cluster [56].

Both cases are significantly different from the complex with AO, which does not indicate any delocalization between the bases, as shown in Chapter 4. Surely, the local DNA structure, as well as the base composition, may differ in these cases. Experimentally, delocalization of the excitation can occur in time-resolved absorption spectra in a time domain shorter than the time of exciton localization. An increase of the ground-state bleaching because of the exciton delocalization was observed in

photosynthetic light-harvesting systems [86, 87], as well as and in the dye-DNA complexes that we studied earlier [88, 98]. Meantime, there was no increase in decay of the time-resolved absorption spectra for the polymer components of DNA compared with monomers. The time resolution in these experiments was about 100 fs [72, 73]. This may indicate that the exciton localization occurs faster than 100 fs. In this regard, experiments with a time resolution of 10 fs in the deep UV range are required, which is currently a very difficult technical task.

6.3. Fluorescence excited state dynamics of an Ag-DNA complex.

In this part, we study the dynamics of the emission spectrum of a Ag-DNA complex on a femtosecond time scale by means of fluorescence up-conversion method. We demonstrate that most of the relaxation from the Franck–Condon state to the emissive state occurs in less than 100 fs. The palette of the DNA-stabilized Ag nanoclusters is spectrally tunable, photostable and bright emitters with the large Stokes shifts. These emitters have ideal properties in microscopy applications where background emission and scattering are a serious problem. Typically, clusters have a relatively large Stokes shift, the difference between the absorption and emission maxima. For instance, a NIR-emitting Ag-DNA cluster demonstrated a shift of 5600 cm^{-1} [159]. The large Stokes shift is a typical demonstration of substantial structural rearrangement and/or solvent relaxation in an excited state. How fast is this relaxation? The dynamic Stokes shift of Ag-DNA clusters observed in nanosecond time-resolved experiments [159-163] did not exceed 200 cm^{-1} in an aqueous solution, which means that the main relaxation occurs on a picosecond and/or femtosecond time scale. Ascertain the mechanisms of the early emission dynamics after photoexcitation in clusters is necessary for the further development of these systems for the applications, in which minimization of nonradiative processes is required to increase the quantum yield of fluorescence and increase the Stokes shift. Though, the emission dynamics of Ag clusters on a femtosecond time scale was almost not studied. Dickson et al. were the first to perform time-resolved experiments on a femtosecond time scale for Ag-DNA clusters [164].

Based on the pump-probe experiments, they suggested a four-state energy diagram for a cluster emitting in the red spectral range. The emissive state of the cluster is formed in 350 fs. An ultrafast ~100 fs relaxation of the excited state of the NIR-emitting Ag-DNA cluster with the Stokes shift of 1000 cm^{-1} was observed by Thyrhaug et al. in recent work [165]. Do other Ag clusters with a large Stokes shift behave in the same way?

Answering this question, we studied the emission dynamics of a Ag-DNA complex by means of the fluorescence up-conversion method. We synthesized a cluster emitting at 525 nm and absorbing at 400 nm (the second harmonic of the laser) on a 15-mer 5'-CGC-CCC-CCT-CGG-CGT-3' DNA. This DNA sequence was used for to synthesize an Ag cluster with excitation/emission maxima of 480/560 nm (see Section 6.2). We changed the synthesis conditions so as to obtain a cluster that absorbs at about 400 nm.

Fig. 6.3.1 illustrates the absorption, fluorescence and fluorescence excitation spectra of the cluster [57].The excitation and emission maxima of the cluster are at 425 nm and 525 nm, respectively. The excitation spectrum is close to the absorption spectrum, which means that mainly one type of molecule is present in the solution [271]. Some difference between the excitation and absorption spectra at the short-wavelength region may be due to the presence of a dark non-emissive cluster and/or to light scattering by the sample. Unfortunately, the sample was unstable during the HPLC purification procedure. The Ag-DNA cluster has a relatively large Stokes shift of 4500 cm^{-1}. A large shift is useful for spectral separation of the excitation and emission of light in microscopy applications. Understanding the nature of the Stokes shift in clusters is essential for the development of new clusters with the desired properties. Usually, the Stokes shift is occurred due to structural relaxation in the excited state. The large Stokes shift implies a significant difference between equilibrium geometry of the ground and excited state. The relaxation includes changes in both the chromophore structure (i.e., the structure of the metal core of the cluster) and the environment (i.e., solvent/DNA) reorganization in the excited state [271]. The rates of these processes can be distinguished using time-resolved emission spectroscopy, since they are different.

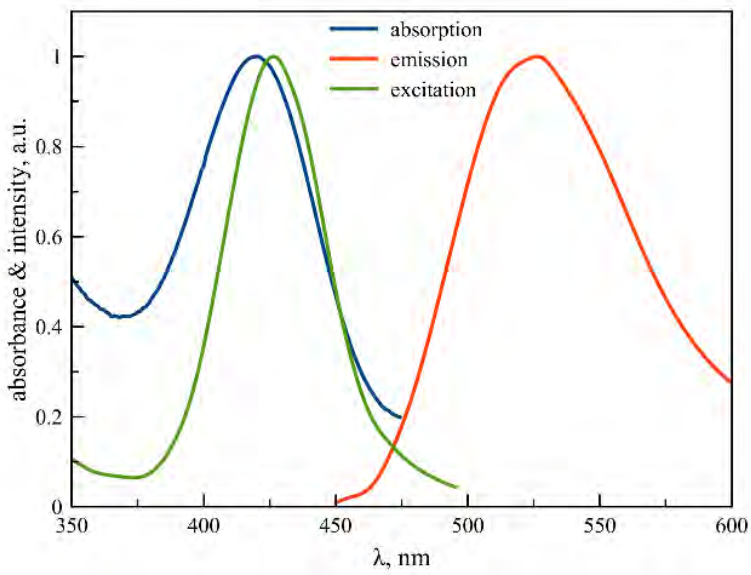


Fig. 6.3.1. Absorption, fluorescence and excitation spectra of the Ag-DNA cluster (λex 400 nm, λem 530 nm) [57].

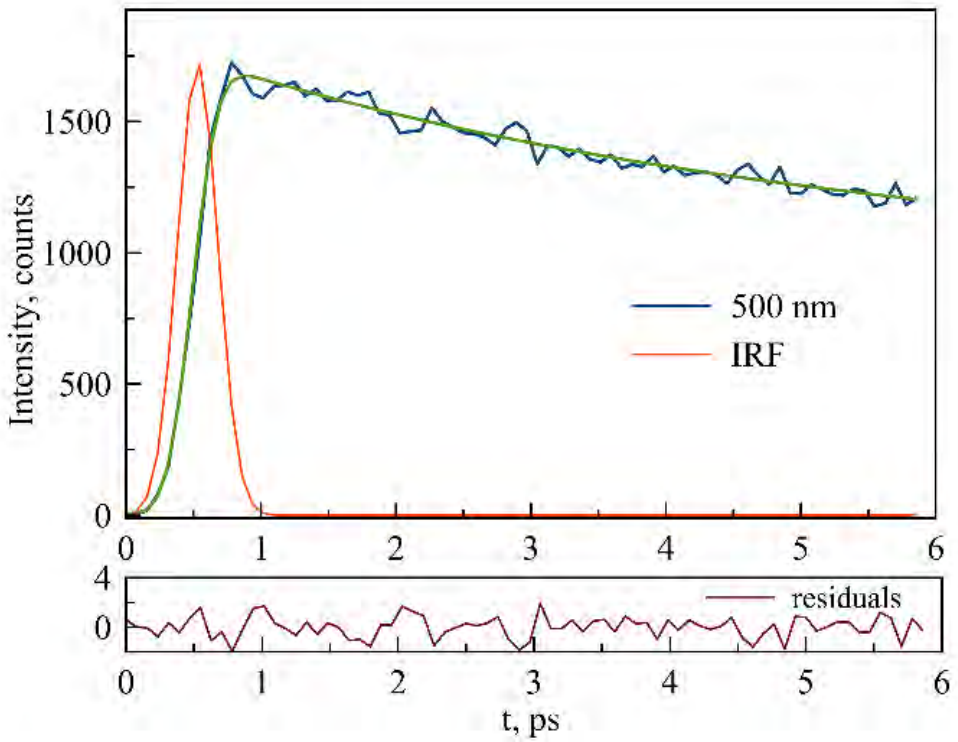


Fig. 6.3.2. The fluorescence decay curve of the Ag-DNA at 500 nm. Fit: (0.4±0.1)exp(-t/5±2) + (0.6±0.1)exp(-t/120) [57].

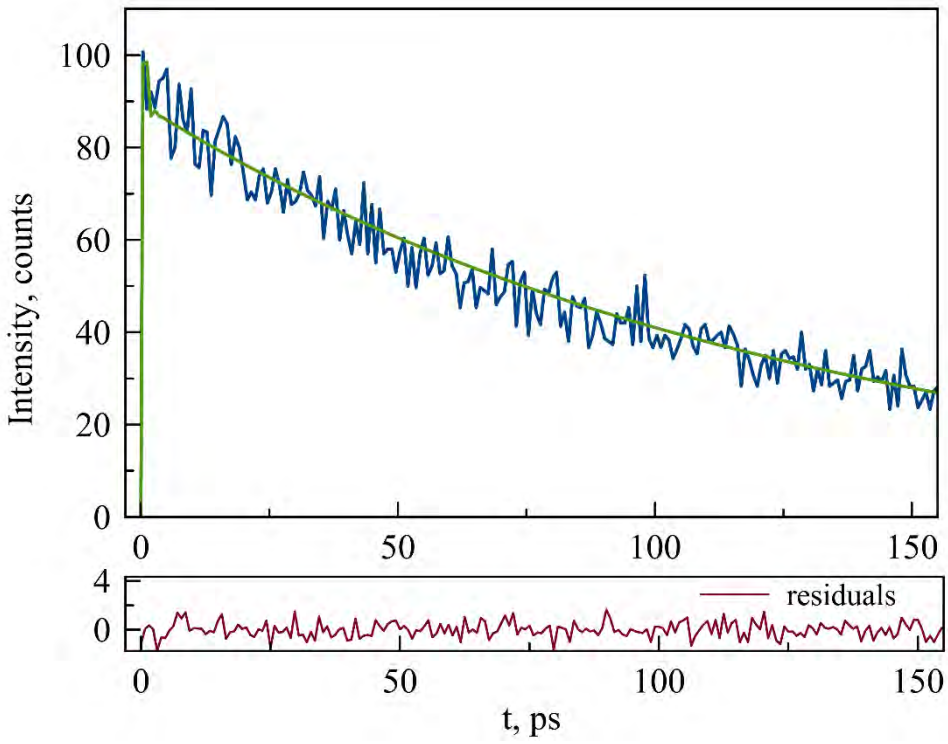


Fig. 6.3.3. The fluorescence decay curve of Ag-DNA at 530 nm. Fit: exp(-t/120±5) [57].

Fig. 6.3.2-6.3.3 illustrate the fluorescence decay curves. The signal increases during a time less than the available time resolution of the device, <100 fs. The fluorescence spectrum recorded at zero-time has a maximum at 510 nm (Fig. 6.3.4). It means that the majority of relaxation >80% from the Franck–Condon state to the emissive state occurs faster than in 100 fs.

A further slight relaxation occurs with time constants ranging from several to hundreds of picoseconds. The fluorescence spectrum is shifted by approximately 300 cm^{-1} to the red side in the first 10 ps After the initial fast relaxation (Fig. 6.3.4). Further during the fluorescence lifetime, a much slower relaxation is occurred. The spectrum shifts by another 300 cm^{-1} in 0.15 ns. The similar dynamic Stokes shifts were observed earlier for the Ag-DNA clusters on a nanosecond time scale [160-165]. These values, though, are much smaller than the Stokes shifts measured between the maxima of the steady-state absorption and emission spectra of the clusters. The small dynamic Stokes

shift observed in the Ag-DNA complex on the picosecond time scale indicates a slight solvent/matrix reorganization in the excited state.

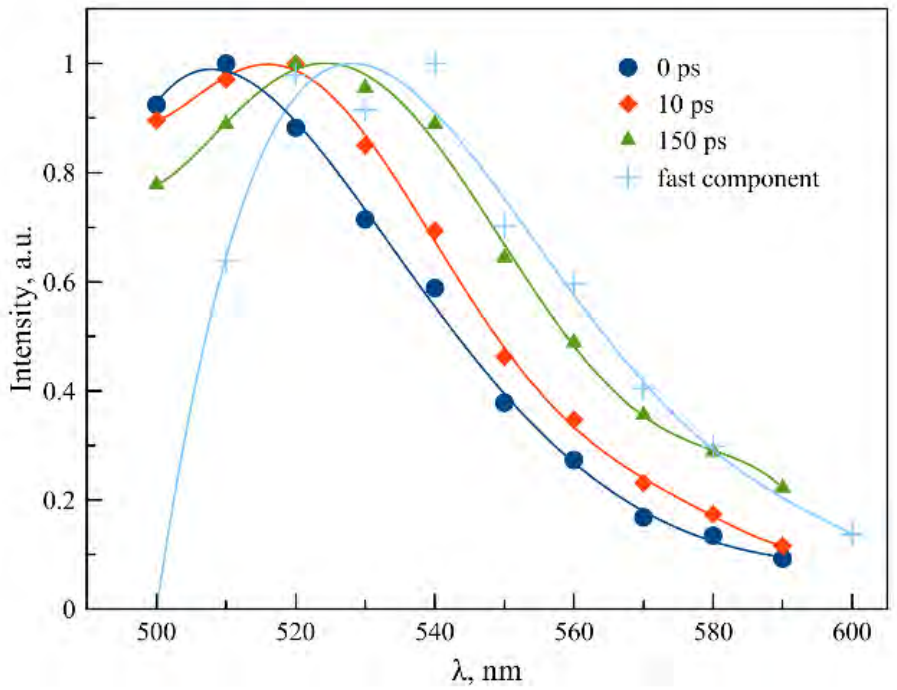


Fig 6.3.4. Time-resolved fluorescence spectra of the Ag-DNA cluster; spectrum of the fast component (see text) [57].

The absence of a substantial dielectric reorganization in the excited state suggests that the dipole moment of the Ag-DNA complex changes insignificantly during excitation. We can conclude that the Stokes shift occurs mainly due to a change in the structure of the cluster in the excited state rather than to the solvent or DNA reorganization, since most of the relaxation in the Ag-DNA complex occurs faster than 100 fs, much faster than the solvent relaxation.

A remarkable feature is observed in the decay curves at wavelengths greater than 500 nm. A fast component appears with a decay time of 200 fs (Fig. 6.3.3). Its spectrum (Fig. 6.3.4) is slightly shifted to the red side relative to the time-resolved and steady-state spectra of the cluster. Though, the decay time of 200 fs does not imply any

contribution to the steady-state emission spectrum. This fast component can be regarded as a manifestation of a non-emissive structure of the Ag-DNA complex (“dark” cluster).

6.4. Conclusions to Chapter 6.

The fluorescence saturation spectroscopy can be used to determine the basic photophysical constants of luminescent Ag-DNA complexes in relatively heterogeneous solutions. We show for two types of clusters that the formation of dark states is a fairly efficient process and occurs on a nanosecond time scale.

In DNA complexes with silver clusters, an effective excitation energy transfer between DNA bases and Ag clusters is observed. The excitation energy is collected from a site with up to 30 bases. Energy transfer occurs in a time faster than 100 fs. DNA intrastrand energy transfer contributes significantly to this process. Such ultrafast, highly efficient energy transfer requires the delocalization of the excitation between DNA bases that are not bound to Ag atoms. The size of the delocalization region (exciton) can be 4-7 bases in a single DNA strand.

The multiple relaxation pathways are observed in the emission dynamics of the green-emitting Ag-DNA cluster. Most of the relaxation from the Franck–Condon state to the emissive state takes place over 100 fs, in spite of a relatively large Stokes shift of 4500 cm^{-1}. As the relaxation in the Ag-DNA complex occurs much faster than typical solvent/DNA relaxation rates, we conclude that the Stokes shift arises mostly due to the change in the geometry of the Ag cluster in the excited state rather than to the solvent/DNA reorganization.

CONCLUSION

In conclusion, it is necessary to note the possible directions for further development of this topic. The development of the instrument base of time-resolved laser spectroscopy with a resolution of the order of 10 fs in the UV region of DNA absorption in recent years has created good prerequisites for the study of primary photoprocesses in DNA with a resolution of several femtoseconds. Such studies can answer fundamental questions regarding coherent effects, delocalization of excitation, the rate of exciplex formation and rapid photochemical reactions in DNA and DNA-based nanostructures, as well as the dependence of these processes on the local structure of DNA. In connection with the development of DNA-based nanotechnologies, in particular, the study of self-organization and formation of DNA nanostructures with the participation of metal ions and clusters, it is necessary to develop a study of photoprocesses in these systems. Emerging studies on the synthesis of crystalline structures of complexes of ions and silver clusters open up prospects for a detailed study of the relationship between the structure and photophysics of the metal-DNA complexes, as well as the development of methods for their theoretical modeling. Such studies are necessary for the targeted synthesis of complexes with desired properties for their further practical application.

ACKNOWLEDGMENTS

I am very grateful to all my colleagues I worked with on this topic. I also want to thank all the people who helped me. Among them were Prof. Nina Kasyanenko, and Prof. Vera Adamchuk (she died in 2016) who supported me in a difficult time. I remember and thank my first tutor, Prof. Viktor Rapoport and also Dr. Vladimir Bakulev, who supervised my PhD Thesis in 2001.

REFERENCES

1. Arndt, M. Quantum physics meets biology / M. Arndt, T. Juffmann, V. Vedral, // HFSP Journal. – 2009. – Vol. 3 (6). – P. 386–400.

2. Fassioli, F. Photosynthetic light harvesting: excitons and coherence / F. Fassioli [et al.] // J. R. Soc. Interface. – 2014. – Vol. 11. – P. 20130901.

3. Sagan, C. Ultraviolet selection pressure on the earliest organisms / C. Sagan // J. Theor. Biol. – 1973. – Vol. 39. – P. 195–200.

4. Skulachev, V. Bioenergetics: the evolution of molecular mechanisms and the development of bioenergetic concepts / V. Skulachev // Antonie van Leeuwenhoek. – 1994. – Vol. 65. – P. 271–284.

5. Bush, C. A. Ultraviolet spectroscopy, circular dichroism, and optical rotatory dispersion / C. A. Bush // Basic Principles in Nucleic Acid Chemistry. Vol. 2 / Ed. O. P. Paul. – Ts'O, Academic Press, New York, 1974. – P. 91–169.

6. Kasha, M. Energy transfer mechanisms and the molecular exciton model for molecular aggregates/ M. Kasha // Radiat. Res. – 1963. – Vol. 20. – P. 55–70.

7. Davydov, A. S. Theory of molecular excitons / A. S. Davydov. – McGraw–Hill, 1962.

8. Long–Range Charge Transfer in DNA. Vols. I and II / Ed. G. B. Schuster. – Springer Berlin Heidelberg, 2004.

9. Slinker, J. D. DNA charge transport over 34 nm / J. D. Slinker [et al.] // Nat Chem. – 2011. – Vol. 3. – P. 228–233.

10. Livshits, G. I. Long–range charge transport in single G–quadruplex DNA molecules / G. I. Livshits [et al.] // Nat Nano advance online publication. – 2014. – Vol. 9 (12). – P. 1040.

11. Guéron, M. Excited states of nucleic acids / M. Guéron, J. Eisinger, A. A. Lamola // Basic Principles in Nucleic Acid Chemistry. Vol. 1 / Ed. O. P. Paul. – Ts'O, Academic Press, New York, 1974. – P. 311–398.

12. Nordlund, T. M. Sequence, structure and energy transfer in DNA / T. M. Nordlund // Photochem. Photobiol. – 2007. – Vol. 83. – P. 625–636.

13. Middleton, C. T. DNA Excited–state dynamics: from single bases to the double helix / C. T. Middleton [et al.] // Annu. Rev. Phys. Chem. – 2009. – Vol. 60. – P. 217–239.

14. Cadet, J. Photoinduced damage to cellular DNA: direct and photosensitized reactions / J. Cadet [et al.] // Photochem. Photobiol. – 2012. – Vol. 88. – P. 1048–1065.

15. Wurtmann E. J, RNA under attack: cellular handling of RNA damage / E. J. Wurtmann, S. L. Wolin // Critical reviews in biochemistry and molecular biology. – 2009. – Vol. 44 (1). – P. 34–49.

16. De Gruijl, F. R. Skin cancer and solar UV radiation / F. R. de Gruijl // Eur. J. Cancer. – 1999. – Vol. 35. – P. 2003–2009.

17. Pfeifer, G. P. Mutations induced by ultraviolet light / G. P. Pfeifer, Y.–H. You, A. Besaratinia // Mutat. Res., Fundam. Mol. Mech. Mutagen. – 2005. – Vol. 571. – P. 19–31.

18. Brash, D. E. UV–induced mutation hotspots occur at DNA damage hotspots / D. E. Brash, W. A. Haseltine // Nature. – 1982. – Vol. 298. – P. 189–192.

19. Baverstock, K. F. Solitons and energy transfer in DNA / K. F. Baverstock // Nature. – 1988. – Vol. 332. – P. 312–313.

20. Sutherland, J. C. Absorption spectrum of DNA for wavelengths greater than 300 nm / J. C. Sutherland, K. P. Griffin // Radiation research. – 1981. – Vol. 86 (3). – P. 399–410.

21. ASTM G173–073 standard tables of reference solar spectral irradiances: Terrestrial Global 37 deg South Facing Tilt [Electronic resource] // The National Renewable Energy Laboratory. – Mode of access: https://www.nrel.gov/grid/solar-resource/spectra.html.

22. Besaratinia, A. Wavelength dependence of ultraviolet radiation–induced DNA damage as determined by laser irradiation suggests that cyclobutane pyrimidine dimers are the principal DNA lesions produced by terrestrial sunlight / A. Besaratinia [et al.] // The FASEB Journal. – 2011. – Vol. 25 (9). – P. 3079–3091.

23. Lange, A. W. Both intra–and interstrand charge–transfer excited states in aqueous B–DNA are present at energies comparable to, or just above, the 1ππ* excitonic bright

states / A. W. Lange, J. M. Herbert // Journal of the American Chemical Society. – 2009. – Vol. 131 (11). – P. 3913–3922.

24. Aquino, A. J. A. The charge-transfer states in a stacked nucleobase dimer complex: A benchmark study / A. J. A. Aquino [et al.] // Journal of computational chemistry. – 2011. – Vol. 32 (7). – P. 1217–1227.

25. Spata, V. A. Bonded excimer formation in π–stacked 9–methyladenine dimers / V. A. Spata, Matsika S. // The Journal of Physical Chemistry A. – 2013. – Vol. 117 (36). – P. 8718–8728.

26. Plasser, F. Electronic excitation and structural relaxation of the adenine dinucleotide in gas phase and solution / F. Plasser, H. Lischka // Photochemical & Photobiological Sciences. – 2013. – Vol. 12 (8). – P. 1440–1452.

27. Ritze, H. H. Electronic coupling in the excited electronic state of stacked DNA base homodimers / H. H. Ritze, P. Hobza, D. Nachtigallová // Physical Chemistry Chemical Physics. – 2007. – Vol. 9 (14). – P. 1672–1675.

28. Plasser, F. UV absorption spectrum of alternating DNA duplexes. Analysis of excitonic and charge transfer interactions / F. Plasser [et al.] // The Journal of Physical Chemistry A. – 2012. – Vol. 116 (46). – P. 11151–11160.

29. Potaman, V. N. DNA: Alternative Conformations and Biology / V. N. Potaman, R. R Sinden // Madame Curie Bioscience Database. – Austin (TX): Landes Bioscience, 2000–2013.

30. Grosberg, Y. Polymers and Biopolymers from Physics Viewpoint Intellect / Y. Grosberg, A.R. Khokhlov. – Moscow, 2010.

31. Grischenko, A.E. Self-organization of polymeric molecules at the interface / A.E. Grischenko, A.I. Kononov, N.A. Mikhailova, – SPb.: S. Petersburg University, 2010 (in Russian).

32. Seeman, N. C. Nanomaterials based on DNA / N. C. Seeman // Annual review of biochemistry. – 2010. – Vol. 79. – P. 65–87.

33. Zikich, D. Ag+–Induced Arrangement of Poly(dC) into Compact Ring–Shaped Structures / D. Zikich, I. Lubitz, A. Kotlyar, // International Review of Biophysical Chemistry (I.RE.BI.C.) –2010 – Vol. 1 (1). – P. 1–6.

34. Kondo, J. A metallo–DNA nanowire with uninterrupted one–dimensional silver array / J. Kondo [et al.] // Nature chemistry. – 2017. – Vol. 9 (10). – P. 956–960.

35. Armitage, B. A. Cyanine dye–DNA interactions: intercalation, groove binding, and aggregation / B. A. Armitage // DNA binders and related subjects. – Springer, Berlin, Heidelberg, 2005. – P. 55–76.

36. Pinheiro, A. V. Challenges and opportunities for structural DNA nanotechnology / A. V. Pinheiro [et al.] // Nature nanotechnology. – 2011. – Vol. 6 (12). – P. 763–772.

37. Ruiz–Carretero, A. DNA–templated assembly of dyes and extended π–conjugated systems / A. Ruiz–Carretero [et al.] // Chemical Communications. – 2011. – Vol. 47 (15). – P. 4340–4347.

38. Wirth, J. Plasmonic nanofabrication by long–range excitation transfer via DNA nanowire / J. Wirth [et al.] // Nano letters. – 2011. – Vol. 11 (4). – P. 1505–1511.

39. Guo, A.–M. Enhanced spin–polarized transport through DNA double helix by gate voltage / A.–M. Guo, Q.–f. Sun // Phys. Rev. B. – 2012. – Vol. 86. – P. 035424.

40. Kuzyk, A. DNA–based self–assembly of chiral plasmonic nanostructures with tailored optical response / A. Kuzyk [et al.] // Nature. – 2012. – Vol. 483. – P. 311–314.

41. Toppari, J. J. Plasmonic coupling and long–range transfer of an excitation along a DNA Nanowire / J. J. Toppari [et al.] // ACS nano. – 2013. – Vol. 7. – P. 1291–1298.

42. Probst, M. A modular LHC built on the DNA three–way junction / M. Probst, S. M. Langenegger, R. Häner, // Chem. Commun. – 2014. – Vol. 50. – P. 159–161.

43. Obliosca, J. M. [et al.] DNA/RNA detection using DNA–templated few–atom silver nanoclusters / J. M. Obliosca [et al.] // Biosensors. – 2013. – Vol. 3 (2). – P. 185–200.

44. Choi, S. Developing Luminescent Silver Nanodots for Biological Applications / S. Choi, R. M. Dickson, J. Yu // Chem. Soc. Rev. – 2012. – Vol. 41. – P. 1867−1891.

45. Ramazanov, R. R. Excitation Spectra Argue for Threadlike Shape of DNA–Stabilized Silver Fluorescent Clusters / R. R. Ramazanov, A. I. Kononov // J. Phys. Chem. C. – 2013. – Vol. 117 (36). – P. 18681–18687.

46. Volkov, I. L. Fluorescent silver nanoclusters in condensed DNA / I. L. Volkov [et al.] // ChemPhysChem. – 2013. – Vol. 14 (15). – P. 3543–3550.

47. Volkov, I. L. DNA–Stabilized Silver Nanoclusters with High Yield of Dark State / I. L. Volkov, P. Yu. Serdobintsev, A. I. Kononov // J. Phys. Chem. C. – 2013. – Vol. 117 (45). – P. 24079–24083.

48. Volkov, I. L. DNA–Stabilized Silver Nanoclusters with High Yield of Dark State Probed by Fluorescence Saturation Spectroscopy / I. L. Volkov, P. Yu. Serdobintsev, A. I. Kononov // Biophys. J. – 2014. – Vol. 106(2). – P. 216a – 217a.

49. Ramazanov, R. R. Noncanonical Stacking Geometries of Nucleobases as a Preferred Target for Solar Radiation / R. R. Ramazanov, D. A. Maksimov, A. I. Kononov // J. Am. Chem. Soc. – 2015. – Vol. 137 (36). – P. 11656–11665.

50. Volkov, I. Fluorescence saturation spectroscopy in probing electronically excited states of silver nanoclusters / I. Volkov [et al.] // J. Lumin. – 2016. – Vol. 172. – P. 175–179.

51. Ramazanov, R. R. Ag−DNA Emitter: Metal Nanorod or Supramolecular Complex? / R. R. Ramazanov [et al.] // J. Phys. Chem. Lett. – 2016. – Vol. 7. – P. 3560−3566.

52. Vdovichev, A. A. Structure of fluorescent metal clusters on a DNA template / A. A. Vdovichev [et al.] // Journal of Physics Conference Series. – 2016. – Vol. 741(1). – P. 012069.

53. Reveguk, Z. Electronic excitation energy transport in a DNA–Ag cluster complex / Z. Reveguk, E. Ikonnikov A. Kononov // Journal of Physics Conference Series. – 2016. – Vol. 741(1). – P. 012051.

54. Maksimov, D.A. Excitation spectra of Ag3–DNA bases complexes: a Benchmark Study / D.A. Maksimov [et al.] // Chemical Physics Letters. – 2017. – Vol. 673. – P. 11–18.

55. Volkov, I. L. DNA with Ionic, Atomic and Clustered Silver: An XPS Study / I. L. Volkov [et al.] // J. Phys. Chem. B. – 2017. – Vol. 121 (11). – P. 2400–2406.

56. Volkov, I. L. DNA as UV light–harvesting antenna / I. L. Volkov [et al.] // Nucleic Acids Res. – 2018. – Vol. 46 (7). – P. 3543–3551.

57. Reveguk, Z. Ultrafast fluorescence dynamics of DNA–based silver clusters / Z. Reveguk [et al.] // Phys. Chem. Chem. Phys. – 2018. – Vol. 20. – P. 28205–28210.

58. Reveguk, Z. V. Exciton Absorption and Luminescence in i–Motif DNA / Z. V. Reveguk [et al.] // Sci. Rep. – 2019. – Vol. 9. – Article number 15988.

59. Yang, M. Influence of Phonons on Exciton Transfer Dynamics: Comparison of the Redfield, Förster, and Modified Redfield Equations / M. Yang, G. R. Fleming // Chem. Phys. – 2002. – Vol. 275. – P. 355–372.

60. Kozak, C. R. Excited–state energies and electronic couplings of DNA base dimmers / C. R. Kozak [et al.] // The Journal of Physical Chemistry B. – 2010. – Vol. 114 (4). – P. 1674–1683.

61. May, V. Charge and Energy Transfer Dynamics in Molecular Systems / V. May, O. Kühn. – Wiley–VCH, 2000. – 559 p.

62. Strümpfer, J. Light Harvesting Complex II B850 Excitation Dynamics / J. Strümpfer, K. Schulten // J. Chem. Phys. – 2009. – Vol. 131. – P. 225101.

63. Novoderezhkin, V. I. Physical origins and models of energy transfer in photosynthetic light–harvesting / V. I. Novoderezhkin [et al.] // Phys. Chem. Chem. Phys. – 2010. – Vol. 12. – P. 7352–7365.

64. Strümpfer, J. How quantum coherence assists photosynthetic light–harvesting / J. Strümpfer, M. Şener, K. Schulten // Journal of Physical Chemistry Letters. – 2012. – Vol. 3. – P. 536–542.

65. Kononov, A. I. Exciton effects in dinucleotides and polynucleotides / A. I. Kononov, V. M. Bakulev, V. L. Rapoport // J. Photochem. Photobiol. B: Biol. – 1993. – Vol. 19. – P. 139–144.

66. Improta, R. Quantum Mechanical Studies on the Photophysics and the Photochemistry of Nucleic Acids and Nucleobases / R. Improta, F. Santoro, L. Blancafort // Chem. Rev. – 2016. – Vol. 116. – P. 3540–3593.

67. Bouvier, B. Dipolar coupling between electronic transitions of the DNA bases and its relevance to exciton states in double helices / B. Bouvier [et al.] // Chem. Phys. – 2002. – Vol. 275. – P. 75–92

68. Bouvier, B. Influence of conformational dynamics on the exciton states of DNA oligomers / B. Bouvier, J–P. Dognon, R. Lavery // J. Phys. Chem. B. – 2003. – Vol. 107. – P. 13512–13522.

69. Emanuele, E. Exciton states of dynamic DNA double helices: alternating dCdG sequences / E. Emanuele [et al.] // J. Phys. Chem. B. – 2005. – Vol. 109. – P. 16109–16118.

70. Emanuele, E. UV spectra and excitation delocalization in DNA: influence of the spectral width / E. Emanuele [et al.] // ChemPhysChem. – 2005. – Vol. 6. – P. 1387–1393.

71. Nachtigallová, D. Electronic splitting in the excited states of DNA base homodimers and –trimers: an evaluation of short–range and Coulombic interactions / D. Nachtigallová, P. Hobza, H.–H. Ritze // Phys. Chem. Chem. Phys. – 2008. – Vol. 10. – P. 5689.

72. Crespo–Hernández, C. E. Base stacking controls excited–state dynamics in A·T DNA / C. E. Crespo–Hernández, B. Cohen, B. Kohler // Nature. – 2005. – Vol. 436. – P. 1141–1144.

73. Su, C. Base–Stacking Disorder and Excited–State Dynamics in Single–Stranded Adenine Homo–oligonucleotides / C. Su, C. T. Middleton, B. Kohler // J. Phys. Chem. B. – 2012. – Vol. 116. – P. 10266–10274.

74. Kwok, W.–M. Femtosecond Time– and Wavelength–Resolved Fluorescence and Absorption Spectroscopic Study of the Excited States of Adenosine and an Adenine Oligomer / W.–M. Kwok, C. Ma, D. L. Phillips // J. Am. Chem. Soc. – 2006. – Vol. 128. – P. 11894–11905.

75. Improta, R. Interplay between “Neutral” and “Charge–Transfer” Excimers Rules the Excited State Decay in Adenine–Rich Polynucleotides / R. Improta, V. Barone // Angew. Chem. Int. Ed. – 2011. – Vol. 50. – P. 12016–12019.

76. Banyasz, A. Multi–Pathway Excited State Relaxation of Adenine Oligomers in Aqueous Solution: A Joint Theoretical and Experimental Study / A. Banyasz [et al.] // Chem. Eur. J. – 2013. – Vol. 19. – P. 3762–3774.

77. Buchvarov, I. Electronic energy delocalization and dissipation in single– and double–stranded DNA / I. Buchvarov [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. – 2007. – Vol. 104. – P. 4794–4797.

78. Markovitsi, D. Collective behavior of franck−condon excited states and energy transfer in DNA double helices / D. Markovitsi [et al.] // J. Amer. Chem. Soc. – 2005. – Vol. 127. – P. 17130–17131.

79. Markovitsi, D. Molecular spectroscopy: complexity of excited–state dynamics in DNA / D. Markovitsi [et al.] // Nature. – 2006. – Vol. 441. – P. E7–E7.

80. Markovitsi, D. Excited states and energy transfer among DNA bases in double helices. Photochem / D. Markovitsi, T. Gustavsson, F. Talbot // Photobiol. Sci. – 2007. – Vol. 6. – P. 717–724.

81. Miannay, F.–A. Ultrafast Excited–State Deactivation and Energy Transfer in Guanine−Cytosine DNA Double Helices / F.–A. Miannay [et al.] // J. Am. Chem. Soc. – 2007. – Vol. 129. – P. 14574–14575.

82. Vayá, I. Fluorescence of natural DNA: from the femtosecond to the nanosecond time scales / I. Vayá [et al.] // J. Amer. Chem. Soc. – 2010. – Vol. 132. – P. 11834–11835.

83. Gustavsson, T. Femtosecond fluorescence studies of DNA/RNA constituents / T. Gustavsson, A. Banyasz, R. Improta // J. Phys. Conf. Ser. – 2011. – Vol. 261. – P. 12009.

84. Vayá, I. Electronic Excitation Energy Transfer between Nucleobases of Natural DNA / I. Vayá [et al.] // J. Am. Chem. Soc. – 2012. – Vol. 134. – P. 11366–11368.

85. Kadhane, U. Strong coupling between adenine nucleobases in DNA single strands revealed by circular dichroism using synchrotron radiation / U. Kadhane [et al.] // Phys. Rev. E – Stat. Nonlinear, Soft Matter Phys. – 2008. – Vol. 77. – P. 21901.

86. Novoderezhkin, V. I. Excitonic interactions in the light–harvesting antenna of photosynthetic purple bacteria and their influence on picosecond absorbency difference spectra / V. I. Novoderezhkin, A. P. Razjivin // FEBS Lett. – 1993. – Vol. 330. – P. 5–7.

87. Novoderezhkin, V. Exciton (de)localization in the LH2 antenna of Rhodobacter sphaeroides as revealed by relative difference absorption measurements of the LH2 antenna and the B820 subunit / V. Novoderezhkin, R. Monshouwer, R. van Grondelle // J. Phys. Chem. B. – 1999. – Vol. 103. – P. 10540–10548.

88. Kononov, A. I. Photophysical Processes in the Complexes of DNA with Ethidium

Bromide and Acridine Orange: A Femtosecond Study / Kononov, A. I. [et al.] // J. Phys. Chem. B. – 2001. – Vol. 105. – P. 535–541.

89. Takaya, T. UV excitation of single DNA and RNA strands produces high yields of exciplex states between two stacked bases / T. Takaya [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2008. – Vol. 105. – P. 10285–10290.

90. Schreier, W.J. Thymine dimerization in DNA is an ultrafast photoreaction / W.J. Schreier [et al.] // Science. – 2007. – Vol. 315. – P. 625–629.

91. Johnson, A. T. Structure and dynamics of poly (T) single–strand DNA: implications toward CPD formation / A. T. Johnson, O. Wiest // The Journal of Physical Chemistry B. – 2007. – Vol. 111 (51). – P. 14398–14404.

92. Law, Y. K. Predicting thymine dimerization yields from molecular dynamics simulations / Y. K. Law [et al.] // Biophysical journal. – 2008. – Vol. 94 (9). – P. 3590–3600.

93. Improta, R. Photophysics and photochemistry of thymine deoxy–dinucleotide in water: A PCM/TD–DFT quantum mechanical study / R. Improta // The Journal of Physical Chemistry B. – 2012. – Vol. 116 (49). – P. 14261–14274.

94. Spata V. A. Role of excitonic coupling and charge–transfer states in the absorption and CD spectra of Adenine–based oligonucleotides investigated through QM/MM simulations / V. A. Spata, S. Matsika // The Journal of Physical Chemistry A. – 2014. – Vol. 118 (51). – P. 12021–12030.

95. Rapoport, V. L. Luminescent conformers of adenyl dinucleotide with strong exciton interaction between nitrogen bases / V. L. Rapoport, A. I. Kononov // Doklady Akademii nauk SSSR. – 1988. – Vol. 298 (1). – P. 231–235.

96. Kononov, A. I. Luminescence excitation spectra reveal low–lying excited states in stacked adenine bases / A. I. Kononov, M. N. Bukina // Journal of Biomolecular Structure and Dynamics. – 2002. – Vol. 20 (3). – P. 465–471.

97. Banyasz, A. Base pairing enhances fluorescence and favors cyclobutane dimer formation induced upon absorption of UVA radiation by DNA / A. Banyasz [et al.] // Journal of the American Chemical Society. – 2011. – Vol. 133 (14). – P. 5163–5165.

98. Kononov, A.I. Study of electron-excited states in polynucleotides and DNA complexes with dyes: PhD Thesis: 01.04.07 / A.I. Kononov. – Saint Petersburg, 2001. – 99 pp. (in Russian).

99. Banyasz, A. Electronic excited states responsible for dimer formation upon UV absorption directly by thymine strands: joint experimental and theoretical study / A. Banyasz [et al.] // Journal of the American Chemical Society. – 2012. – Vol. 134 (36). – P. 14834–14845.

100. Becker, M. M. "Ultraviolet footprinting" accurately maps sequence–specific contacts and DNA kinking in the EcoRI endonuclease–DNA complex / M. M. Becker [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1988. – Vol. 85 (17). – P. 6247–6251.

101. Pfeifer, G. P. Binding of transcription factors creates hot spots for UV photoproducts in vivo / G. P. Pfeifer [et al.] // Molecular and cellular biology. – 1992. – Vol. 12 (4). – P. 1798–1804.

102. Tyrrell, R. M. Mutagenic action of monochromatic UV radiation in the solar range on human cells / R. M. Tyrrell // Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. – 1984. – Vol. 129 (1). – P. 103–110.

103. Mitchell, D. L. Sequence specificity of cyclobutane pyrimidine dimers in DNA treated with solar (ultraviolet B) radiation / D. L. Mitchell, J. Jen, J. E. Cleaver // Nucleic acids research. – 1992. – Vol. 20 (2). – P. 225–229.

104. Pfeifer, G. P. UV wavelength–dependent DNA damage and human non–melanoma and melanoma skin cancer / G. P. Pfeifer, A. Besaratinia // Photochemical & photobiological sciences. – 2012. – Vol. 11 (1). – P. 90–97.

105. Tommasi, S. Sunlight induces pyrimidine dimers preferentially at 5–methylcytosine bases / S. Tommasi, M. F. Denissenko, G. P. Pfeifer // Cancer research. – 1997. – Vol. 57 (21). – P. 4727–4730.

106. Gale, J. M. UV–induced formation of pyrimidine dimers in nucleosome core DNA is strongly modulated with a period of 10.3 bases / J. M. Gale, K. A. Nissen, M. J. Smerdon // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1987. – Vol. 84 (19). – P. 6644–6648.

107. Selleck, S. B. Photofootprinting in vivo detects transcription–dependent changes in yeast TATA boxes / S. B. Selleck, J. Majors // Nature. – 1987. – Vol. 325 (6100). – P. 173–177.

108. Freeman, S. E. Wavelength dependence of pyrimidine dimer formation in DNA of human skin irradiated in situ with ultraviolet light / S. E. Freeman [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1989. – Vol. 86 (14). – P. 5605–5609.

109. Garces, F. Alterations in DNA irradiated with ultraviolet radiation—I. The formation process of cyclobutylpyrimidine dimers: cross sections, action spectra and quantum yields / F. Garces, C. A. Davila // Photochemistry and photobiology. – 1982. – Vol. 35 (1). – P. 9–16.

110. Leupold, D. Size Enhancement of Transition Dipoles to One– and Two–Exciton Bands in a Photosynthetic Antenna / D. Leupold [et al.] // Phys. Rev. Lett. – 1996. – Vol. 77. – P. 4675–4678.

111. Engel, G. S. Evidence for Wavelike Energy Transfer Through Quantum Coherence in Photosynthetic Systems / G. S. Engel [et al.] // Nature. – 2007. – Vol. 446. – P. 782–786.

112. Rayner, D. M. Singlet energy transfer between nucleic acid bases and dyes in intercalation complexes / D. M. Rayner [et al.] // J. Phys. Chem. – 1980. – Vol. 84. – P. 289–293.

113. Nostrand, van F. Singlet excitation transfer from poly rA to bound dye at 77K / F. van Nostrand, R. M. Pearlstein // Chem. Phys. Lett. – 1976. – Vol. 39. – P. 269–272.

114. Pearlstein, R. M. Time dependence of triplet–singlet excitation transfer from compact poly rA to bound dye at 77 K / R. M. Pearlstein, F. van Nostrand, J. A. Nairn // Biophys. J. – 1979. – Vol. 26. – P. 61–72.

115. Rist, M. Exciton and Excimer Formation in DNA at Room Temperature / M. Rist, H.–A. Wagenknecht, T. Fiebig // ChemPhysChem. – 2002. – Vol. 3. – P. 704–707.

116. Dumas, A. Highly fluorescent guanosine mimics for folding and energy transfer studies / A. Dumas, N. W. Luedtke // Nucleic Acids Res. – 2011. – Vol. 39. – P. 6825–6834.

117. O'Neill, P. R. UV Excitation of DNA Stabilized Ag Cluster Fluorescence via the DNA Bases / P. R. O'Neill [et al.] // J. Phys. Chem. C. – 2011. – Vol. 115. – P. 24061–24066.

118. Jin, R. Atomically precise metal nanoclusters: stable sizes and optical properties / R. Jin // Nanoscale. – 2015. – Vol. 7 (5). – P. 1549–1565.

119. Chakraborty, I. Atomically precise clusters of noble metals: emerging link between atoms and nanoparticles / I. Chakraborty, T. Pradeep // Chemical reviews. – 2017. – Vol. 117 (12). – P. 8208–8271.

120. Lu, Y. Sub–Nanometre Sized Metal Clusters: From Synthetic Challenges to the Unique Property Discoveries / Y. Lu, W. Chen // Chem. Soc. Rev. — 2012. – Vol. 41. – P. 3594–3623.

121. Petty, J. T. DNA–templated Ag nanocluster formation / J. T. Petty [et al.] // Journal of the American Chemical Society. – 2004. – Vol. 126 (16). – P. 5207–5212.

122. Han, B. DNA–templated fluorescent silver nanoclusters / B. Han, E. Wang // Anal Bioanal Chem. – 2012. – Vol. 402. – P. 129–138.

123. Yu. J. Live cell surface labeling with fluorescent Ag nanocluster composites / J. Yu [et al.] // Photochem. Photobiol. – 2008. – Vol. 84. – P. 1435.

124. Li, T. Ion–tuned DNA/Ag fluorescent nanoclusters as versatile logic device / T. Li [et al.] // ACS Nano. – 2011. – Vol. 5. – P. 6334–6338.

125. Guo, W. Strand exchange reaction modulated fluorescence "on–off" switching of hybridized DNA duplex stabilized silver nanoclusters / W. Guo, J. Yuan, E.K. Wang // Chem. Comm. – 2011. – Vol. 47 – P. 10930–10933.

126. Guo, W.W. Highly sequence dependent formation of fluorescent silver nanoclusters in hybridized DNA duplexes for single nucleotide mutation identification / W.W. Guo // J. Am. Chem. Soc. – 2010. – Vol. 132. – P. 932–934.

127. Ma, K. DNA abasic site–directed formation of fluorescent silver nanoclusters for selective nucleobase recognition / Ma, K [et al.] // Nanotechnology. – 2011. – Vol. 22. – P. 305502–305507.

128. Yeh, H.–C. A fluorescence light–up Ag nanocluster probe that discriminates single–nucleotide variants by emission color / H.–C. Yeh [et al.] // J. Am. Chem. Soc. – 2012. – Vol. 134. – P. 11550–11558.

129. Yang, S.W. Rapid detection of microRNA by a silver nanocluster DNA probe / S.W. Yang, T. Vosch // Anal. Chem. – 2011. – Vol. 83. – P. 6935–6939.

130. Yeh, H.–C. A DNA–silver nanocluster probe that fluoresces upon hybridization / H.–C. Yeh [et al.] // Nano Lett. – 2010. – Vol. 10. – P. 3106–3110.

131. Yuan, Z. Fluorescent silver nanoclusters stabilized by DNA scaffolds. Chem / Z. Yuan [et al.] // Comm. – 2014. – Vol. 50. – P. 8900–9815.

132. Schultz, D. Silver Atom and Strand Numbers in Fluorescent and Dark Ag:DNAs / Schultz, D.; Gwinn, E. G. // Chem. Commun. (Cambridge, England). – 2012. – Vol. 48. – P. 5748–5750.

133. Petty, J. T. A Silver Cluster–DNA Equilibrium / J. T. Petty [et al.] // Anal. Chem. – 2013. – Vol. 85. – P. 9868–9876.

134. Samanta, P. K. Computational Studies on Structural and Optical Properties of Single–Stranded DNA Encapsulated Silver/gold Clusters / Samanta, P. K. [et al.] // J. Mater. Chem. – 2012. Vol. 22. – P. 6774.

135. Soto-Verdugo. V. The Properties of Small Ag Clusters Bound to DNA Bases / V. Soto-Verdugo, H. Metiu, E. Gwinn // J. Chem. Phys. – 2010. – Vol. 132. – P. 195102.

136. Zhu, M. Correlating the Crystal Structure of A Thiol–Protected Au 25 Cluster and Optical Properties / M. Zhu [et al.] // J. Am. Chem. Soc. – 2008. – Vol. 130. – P. 5883–5885.

137. Gell, L. Tuning Structural and Optical Properties of Thiolate–Protected Silver Clusters by Formation of a Silver Core with Confined Electrons / L. Gell [et al.] // J. Phys. Chem. C. – 2013. – Vol. 117. – P. 14824–14831.

138. Lecoultre, S. Ultraviolet–visible absorption of small silver clusters in neon: Ag n (n= 1–9) / S. Lecoultre [et al.] // The Journal of chemical physics. – 2011. – Vol. 134 (18). – P. 184504.

139. Matulis, V. E. DFT study of electronic structure and geometry of neutral and anionic silver clusters / V. E. Matulis, O. A. Ivashkevich, V. S. Gurin // Journal of Molecular Structure: THEOCHEM. – 2003. – Vol. 664. – P. 291–308.

140. Bonačić–Koutecký, V. An accurate relativistic effective core potential for excited states of Ag atom: An application for studying the absorption spectra of Ag n and Ag n+ clusters / V. Bonačić–Koutecký [et al.] // The Journal of chemical physics. – 1999. – Vol. 110 (8). – P. 3876–3886.

141. Harb, M. Optical absorption of small silver clusters: Ag n, (n= 4–22) / M. Harb [et al.] // The Journal of chemical physics. – 2008. – Vol. 129 (19). – P. 194108.

142. Guidez, E. B. Theoretical analysis of the optical excitation spectra of silver and gold nanowires / E. B. Guidez, C. M. Aikens // Nanoscale. – 2012. – Vol. 4 (14). – P. 4190–4198.

143. Swasey, S. M. Chiral Electronic Transitions in Fluorescent Silver Clusters Stabilized by DNA / S. M. Swasey [et al.] // ACS Nano. – 2014. – Vol. 8. – P. 6883−6892.

144. Copp, S. M. Cluster Plasmonics: Dielectric and Shape Effects on DNA–Stabilized Silver Clusters / S. M. Copp [et al.] // Nano Lett. – 2016. – Vol. 16. – P. 3594−3599.

145. Harbich, W. Deposition of mass selected silver clusters in rare gas matrices / W. Harbich // J. Chem. Phys. – 1990. – Vol. 93. – P. 8535−8543.

146. Rabin, I. Absorption and fluorescence spectra of Ar–matrixisolated Ag3 clusters / I. Rabin [et al.] // Chem. Phys. Lett. – 2000. – Vol. 320. – P. 59−64.

147. De Cremer, G. Characterization of Fluorescence in Heat–Treated Silver–Exchanged Zeolites / G. De Cremer [et al.] // J. Am. Chem. Soc. – 2009. – Vol. 131. – P. 3049−3056.

148. Altantzis, T. Direct Observation of Luminescent Silver Clusters Confined in Faujasite Zeolites / T. Altantzis [et al.] // ACS Nano. – 2016. – Vol. 10. – P. 7604.

149. Schultz, D. Evidence for Rod–Shaped DNA–Stabilized Silver Nanocluster Emitters / D. Schultz [et al.] // Adv. Mater. – 2013. – Vol. 25. – P. 2797–2803.

150. Copp, S. M. Magic Numbers in DNA–Stabilized Fluorescent Silver Clusters Lead to Magic Colors / S. M. Copp // J. Phys. Chem. Lett. – 2014. – Vol. 5. – P. 959–963.

151. Gwinn, E. G. Sequence-Dependent fluorescence of DNA-Hosted silver nanoclusters / E. G. Gwinn [et al.] // Advanced Materials. – 2008. – Vol. 20 (2). – P. 279–283.

152. Huang, Z. Site–specific DNA–programmed growth of fluorescent and functional silver nanoclusters / Z. Huang [et al.] // Chemistry. – 2011. – Vol. 17. – P. 3774–3780.

153. Ono, A. Specific interactions between silver(I) ions and cytosine–cytosine pairs in DNA duplexes / A. Ono [et al.] // Chem. Commun. (Camb). – 2008. – Vol. 39. – P. 4825–4827.

154. Megger, D. A. Silver(I)–mediated cytosine self–pairing is preferred over hoogsteen–type base pairs with the artificial nucleobase 1,3–dideaza–6–nitropurine. Nucleosides / D. A. Megger, J. Muller // Nucleotides Nucleic Acids. – 2010. – Vol. 29. – P. 27–38.

155. Urata, H. Pyrimidine–pyrimidine base pairs stabilized by silver(I) ions / H. Urata [et al.] // Chem. Commun. (Camb). – 2011. – Vol. 47. – P. 941–943.

156. Swasey, S. M. Silver (I) as DNA glue: Ag(+)–mediated guanine pairing revealed by removing Watson–Crick constraints / S. M. Swasey [et al.] // Sci. Rep. – 2015. – Vol. 5. – P. 10163–10171.

157. Petty, J. T. A Segregated, Partially Oxidized, and Compact Ag10 Cluster within an Encapsulating DNA Host / J. T. Petty [et al.] // J. Am. Chem. Soc. – 2016. – Vol. 138. – P. 3469–3477.

158. Huard, D. J. E. Atomic Structure of a Fluorescent Ag8 Cluster Templated by a Multistranded DNA Scaffold / D. J. E. Huard [et al.] // J. Am. Chem. Soc. – 2019. – Vol. 141. – P. 11465–11470.

159. Bogh, S. A. Unusually large Stokes shift for a near–infrared emitting DNA–stabilized silver nanocluster / S. A. Bogh [et al.] // Methods and applications in fluorescence. – 2018. – Vol. 6 (2). – P. 024004.

160. Hsu, H. C. DNA stabilized silver nanoclusters as the fluorescent probe for studying the structural fluctuations and the solvation dynamics of human telomeric

DNA / H. C. Hsu [et al.] // New Journal of Chemistry. – 2015. – Vol. 39 (3). – P. 2140–2145.

161. Wang, K. H. The spectral relaxation dynamics and the molecular crowding effect of silver nanoclusters synthesized in the polymer scaffold / K. H. Wang, C. W. Chang // Physical Chemistry Chemical Physics. – 2015. – Vol. 17 (35). – P. 23140–23146.

162. Bogh, S. A. Excited–State Relaxation and Förster Resonance Energy Transfer in an Organic Fluorophore/Silver Nanocluster Dyad / S. A. Bogh [et al.] // Acs Omega. – 2017. – Vol. 2 (8). – P. 4657–4664.

163. Cerretani, C. Temperature dependent excited state relaxation of a red emitting DNA–templated silver nanocluster / C. Cerretani [et al.] // Chemical Communications. – 2017. – Vol. 53 (93). – P. 12556–12559.

164. Patel, S. A. Electron transfer–induced blinking in Ag nanodot fluorescence / S. A. Patel [et al.] // The Journal of Physical Chemistry C. – 2009. – Vol. 113 (47). – P. 20264–20270.

165. Thyrhaug, E. Ultrafast coherence transfer in DNA–templated silver nanoclusters / E. Thyrhaug [et al.] // Nature communications. – 2017. –Vol. 8 (1). – P. 1–7.

166. Hsiang, J. C. Dark State–Modulated Fluorescence Correlation Spectroscopy for Quantitative Signal Recovery / J. C. Hsiang, B. C. Fleischer, R. M. Dickson // The journal of physical chemistry letters. – 2016. – Vol. 7 (13). – P. 2496–2501.

167. Fadeev, V.V. Saturation spectroscopy as a method for determining the photophysical parameters of complicated organic compounds / V. V. Fadeev, T. A. Dolenko, E. M. Filippova [et al.] // Opt. Commun. – 1999. – Vol. 166 (1–6). – P. 25–33.

168. Valeur, B. Molecular Fluorescence: Principles and Applications / B. Valeur, M.N. Berberan–Santos. – 2nd edition. – Wiley–VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, 2012.

169. Parker, C.A. Photoluminescence of solutions: With applications to photochemistry and analytical chemistry / C.A. Parker. – Elsevier Pub. Co., 1968.

170. Briggs, D. Surface Analysis by Auger and X–Ray Photoelectron Spectroscopy / D. Briggs, J. T. Grant. – IM Publications: Charlton, U.K., 2003.

171. Pronk, S. GROMACS 4.5: a high–throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit / S. Pronk [et al.] // Bioinformatics. – 2013. – Vol. 29 (7). – P. 845–854.

172. Pérez, A. Refinement of the AMBER force field for nucleic acids: improving the description of alpha/gamma conformers / A. Pérez [et al.] // Biophys. J. – 2007. – Vol. 92. – P. 3817–3829.

173. Darden T. Particle mesh Ewald: An N-log (N) method for Ewald sums in large systems / T. Darden, D. York, L. Pedersen // The Journal of chemical physics. – 1993. – Vol. 98 (12). – P. 10089–10092.

174. Hess, B. LINCS: a linear constraint solver for molecular simulations / B. Hess [et al.] // Journal of computational chemistry. – 1997. – Vol. 18 (12). – P. 1463–1472.

175. Bernholdt, D. E. Large–scale correlated electronic structure calculations: the RI–MP2 method on parallel computers / D. E. Bernholdt, R. J. Harrison // Chemical Physics Letters. – 1996. – Vol. 250 (5–6). – P. 477–484.

176. Dunning, Jr T. H. Gaussian basis sets for use in correlated molecular calculations. I. The atoms boron through neon and hydrogen / Jr T. H. Dunning // The Journal of chemical physics. – 1989. – Vol. 90 (2). – P. 1007–1023.

177. Neese, F. The ORCA program system / F. Neese // Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science. – 2012. – Vol. 2 (1). – P. 73–78.

178. Head–Gordon, M. A doubles correction to electronic excited states from configuration interaction in the space of single substitutions / M. Head–Gordon [et al.] // Chemical Physics Letters. – 1994. – Vol. 219 (1–2). – P. 21–29.

179. Christiansen, O. The second–order approximate coupled cluster singles and doubles model CC2 / O. Christiansen, H. Koch, P. Jørgensen // Chemical Physics Letters. – 1995. – Vol. 243 (5–6). – P. 409–418.

180. Trofimov, A. B. An efficient polarization propagator approach to valence electron excitation spectra / A. B. Trofimov, J. Schirmer // Journal of Physics B: Atomic, Molecular and Optical Physics. – 1995. – Vol. 28 (12). – P. 2299–2324.

181. Hättig, C. CC2 excitation energy calculations on large molecules using the resolution of the identity approximation / C. Hättig, F. Weigend // The Journal of Chemical Physics. – 2000. – Vol. 113 (13). – P. 5154–5161.

182. A package for Theoretical Density, Orbital Relaxation and Exciton analysis [Electronic resource] // TheoDore. – Mode of access: http://theodore–qc.sourceforge.net/index.html.

183. Tretiak, S. Density matrix analysis and simulation of electronic excitations in conjugated and aggregated molecules / S. Tretiak, S. Mukamel // Chemical reviews. – 2002. – Vol. 102 (9). – P. 3171–3212.

184. Ahlrichs, R. Electronic structure calculations on workstation computers: The program system turbomole / R. Ahlrichs [et al.] // Chemical Physics Letters. – 1989. – Vol. 162 (3). – P. 165–169.

185. VandeVondele, J. Quickstep: Fast and accurate density functional calculations using a mixed Gaussian and plane waves approach / J. VandeVondele [et al.] // Comput. Phys. Commun. – 2005. – Vol. 167. – P. 103–128.

186. Goedecker, S. Separable dual–space Gaussian pseudopotentials / S. Goedecker, M. Teter, J. Hutter // Phys. Rev. B. – 1996. – Vol. 54. – P. 1703–1710.

187. VandeVondele, J. Gaussian basis sets for accurate calculations on molecular systems in gas and condensed phases / J. VandeVondele, J. Hutter // J. Chem. Phys. – 2007. – Vol. 127. – P. 114105–114109.

188. Perdew, J. P. Generalized Gradient Approximation Made Simple / J.P. Perdew, K. Burke, M. Ernzerhof // Phys. Rev. Lett. – 1996. – Vol. 77. – P. 3865–3868.

189. Adamo, C. Toward Reliable Density Functional Methods without Adjustable Parameters: The PBE0 Model / C. Adamo, V. Barone // J. Chem. Phys. – 1999. – Vol. 110. – P. 6158–6170.

190. Weigend, F. Balanced Basis Sets of Split Valence, Triple Zeta Valence and Quadruple Zeta Valence Quality for H to Rn: Design and Assessment of Accuracy / F. Weigend, R. Ahlrichs // Phys. Chem. Chem. Phys. – 2005. – Vol. 7. – P. 3297–3305.

191. Granovsky, A. A. Firefly Version 8 [Electroniv resource] / A. A. Granovsky // Firefly. – Mode of access: www http//classic.chem.msu.su/gran/firefly/index.html.

192. Zhao, Y. The M06 suite of density functionals for main group thermochemistry, thermochemical kinetics, noncovalent interactions, excited states, and transition elements: two new functionals and systematic testing of four M06–class functionals and 12 other functionals, Theor / Y. Zhao, D.G. Truhlar, // Chem. Acc. – 2008. – Vol.120 (1). – P. 215–241.

193. Gordon, M. S. Advances in electronic structure theory: GAMESS a decade later / M. S. Gordon, M. W. Schmidt // Theory and applications of computational chemistry / Ed. C.E. Dykstra. – Elsevier, 2005. – P. 1167–1189.

194. Hay, P. J. Ab initio effective core potentials for molecular calculations. Potentials for the transition metal atoms Sc to Hg / P. J. Hay, W. R. Wadt // The Journal of chemical physics. – 1985. – Vol. 82 (1). – P. 270–283.

195. Hariharan, P. C. The influence of polarization functions on molecular orbital hydrogenation energies / P. C. Hariharan, J. A. Pople // Theoretica chimica acta. – 1973. – Vol. 28 (3). – P. 213–222.

196. Hammer, B. Improved adsorption energetics within density–functional theory using revised Perdew–Burke–Ernzerhof functional / B. Hammer, L. B. Hansen, J. K. Nørskov // Physical review B. – 1999. – Vol. 59 (11). – P. 7413–7421.

197. Becke A. D. Density–functional exchange–energy approximation with correct asymptotic behavior // Physical review A. – 1988. – Vol. 38 (6). – P. 3098–3100.

198. Soler–López, M. Solvent Organization in an Oligonucleotide Crystal THE STRUCTURE OF d (GCGAATTCG) 2 AT ATOMIC RESOLUTION / M. Soler–López, L. Malinina, J. A. Subirana // Journal of Biological Chemistry. – 2000. – Vol. 275 (30). – P. 23034–23044.

199. Kielkopf, C. L. Conformational flexibility of B–DNA at 0.74 Å resolution: d (CCAGTACTGG) 2 / C. L. Kielkopf [et al.] // Journal of molecular biology. – 2000. – Vol. 296 (3). – P. 787–801.

200. McCullagh, M. Conformational control of TT dimerization in DNA conjugates. A molecular dynamics study / M. McCullagh [et al.] // The Journal of Physical Chemistry B. – 2010. – Vol. 114 (15). – P. 5215–5221.

201. Fisher, G.J. Pyrimidine photohydratcs / G.J. Fisher, H.E. Johns // Photochem. Photobiol. Nucleic Acids / Ed. S. Y. Wang. – Acad. Press. New York, 1976. – Vol. 1. – P. 225–294.

202. Nonin, S. Solution structure and base pair opening kinetics of the i–motif dimer of d (5mCCTTTACC): a noncanonical structure with possible roles in chromosome stability / S. Nonin, A. T. Phan, J. L. Leroy // Structure. – 1997. – Vol. 5 (9). – P. 1231–1247.

203. Jourdan, M. Double threading through DNA: NMR structural study of a bis–naphthalene macrocycle bound to a thymine–thymine mismatch / M. Jourdan [et al.] // Nucleic acids research. – 2012. – Vol. 40 (11). – P. 5115–5128.

204. Smirnov, S. Integrity of duplex structures without hydrogen bonding: DNA with pyrene paired at abasic sites / S. Smirnov [et al.] // Nucleic acids research. – 2002. – Vol. 30 (24). – P. 5561–5569.

205. Serrano–Pérez, J. J. Theoretical insight into the intrinsic ultrafast formation of cyclobutane pyrimidine dimers in UV–irradiated DNA: Thymine versus cytosine / J. J. Serrano–Pérez [et al.] // The Journal of Physical Chemistry B. – 2008. – Vol. 112 (45). – P. 14096–14098.

206. Kumar, S. The isolation and characterisation of a new type of dimeric adenine photoproduct in UV–irradiated deoxyadenylates / S. Kumar [et al.] // Nucleic acids research. – 1987. – Vol. 15 (3). – P. 1199–1216.

207. Wei, H. Singlet oxygen involvement in ultraviolet (254 nm) radiation–induced formation of 8–hydroxy–deoxyguanosine in DNA / H. Wei [et al.] // Free Radical Biology and Medicine. – 1997. – Vol. 23 (1). – P. 148–154.

208. Doorley, G. W. Tracking DNA excited states by picosecond–time–resolved infrared spectroscopy: signature band for a charge–transfer excited state in stacked adenine–thymine systems / G. W. Doorley [et al.] // The Journal of Physical Chemistry Letters. – 2013. – Vol. 4 (16). – P. 2739–2744.

209. Zhang, Y. UV–induced proton transfer between DNA strands / Y. Zhang [et al.] // Journal of the American Chemical Society. – 2015. – Vol. 137 (22). – P. 7059–7062.

210. 209 Lin, C. H. Encapsulating an amino acid in a DNA fold / C. H. Lin, D. J. Patel // Nature structural biology. – 1996. – Vol. 3 (12). – P. 1046–1050.

211. Flinders, J. A pH controlled conformational switch in the cleavage site of the VS ribozyme substrate RNA / J. Flinders, T. Dieckmann // Journal of molecular biology. – 2001. – Vol. 308 (4). – P. 665–679.

212. Plasser, F. Analysis of excitonic and charge transfer interactions from quantum chemical calculations / F. Plasser, H. Lischka // Journal of chemical theory and computation. – 2012. – Vol. 8 (8). – P. 2777–2789.

213. Schreier, W. J. Thymine dimerization in DNA model systems: cyclobutane photolesion is predominantly formed via the singlet channel / W. J. Schreier [et al.] // Journal of the American Chemical Society. – 2009. – Vol. 131 (14). – P. 5038–5039.

214. Boggio–Pasqua, M. Ultrafast deactivation channel for thymine dimerization / M. Boggio–Pasqua [et al.] // Journal of the American Chemical Society. – 2007. – Vol. 129 (36). – P. 10996–10997.

215. Blancafort, L. Modeling thymine photodimerizations in DNA: mechanism and correlation diagrams / L. Blancafort, A. Migani // Journal of the American Chemical Society. – 2007. – Vol. 129 (47). – P. 14540–14541.

216. Johns, H. E. Properties of the triplet states of thymine and uracil in aqueous solution / H. E. Johns, D. W. Whillans // Journal of the American Chemical Society. – 1971. – Vol. 93 (6). – P. 1358–1362.

217. Gehring, K. A tetrameric DNA structure with protonated cytosine–cytosine base pairs / K. Gehring, J. L. Leroy, M. Guéron // Nature. – 1993. – Vol. 363 (6429). – P. 561–565.

218. Zikich, D. I–Motif Nanospheres: Unusual Self–Assembly of Long Cytosine Strands / D. Zikich [et al.] // Small. – 2011. – Vol. 7. – P. 1029–1034.

219. Khan, N. Solution equilibria of the i–motif–forming region upstream of the B–cell lymphoma–2 P1 promoter / N. Khan [et al.] // Biochimie. – 2007. – Vol. 89 (12). – P. 1562–1572.

220. Antao, V. P. CD Spectral Comparisons of the Acid–Induced Structures of Poly [d (A)] Poly [r (A)], Poly [d (C)], and Poly [r (C)] / V. P. Antao, D. M. Gray // Journal of Biomolecular Structure and Dynamics. – 1993. – Vol. 10 (5). – P. 819–839.

221. Holm, A. I. S. Electronic coupling between cytosine bases in DNA single strands and i–motifs revealed from synchrotron radiation circular dichroism experiments / A. I. S. Holm [et al.] // Physical Chemistry Chemical Physics. – 2010. – Vol. 12 (14). – P. 3426–3430.

222. Phan, A. T. The solution structure and internal motions of a fragment of the cytidine–rich strand of the human telomere / A. T. Phan, M. Guéron, J. L. Leroy // Journal of molecular biology. – 2000. – Vol. 299 (1). – P. 123–144.

223. Beenken, W. J. D. Spectroscopic units in conjugated polymers: a quantum chemically founded concept? / W. J. D. Beenken, T. Pullerits // The Journal of Physical Chemistry B. – 2004. – Vol. 108 (20). – P. 6164–6169.

224. Pollum, M. Photochemistry of Nucleic Acid Bases and Their Thio– and Aza–Analogues in Solution / M. Pollum, L. Martínez–Fernández, C. E. Crespo–Hernández // Photoinduced Phenomena in Nucleic Acids I / Eds. M. Barbatti, A. C. Borin, S. Ullrich. – Springer International Publishing, 2014. – 355 p. – P. 245–327.

225. Nielsen, L. M. Electronic coupling between photo–excited stacked bases in DNA and RNA strands with emphasis on the bright states initially populated / L. M. Nielsen, S. V. Hoffmann, S. B. Nielsen // Photochem. Photobiol. Sci. – 2013. – Vol. 12. – P. 1273.

226. Fujii, T. Structure and Dynamics of Electron Injection and Charge Recombination in i–Motif DNA Conjugates / T. Fujii [et al.] // J. Phys. Chem. B. – 2017. – Vol. 121. – P. 8058–8068.

227. Thazhathveetil, A. K. Efficient Charge Transport via DNA G–Quadruplexes / A. K. Thazhathveetil [et al.] // J. Am. Chem. Soc. – 2017. – Vol. 139. – .P. 1730–1733.

228. Zeraati, M. I–motif DNA structures are formed in the nuclei of human cells / M. Zeraati [et al.] // Nat. Chem. – 2018. – Vol. 10. – P. 631–637.

229. Dong, Y. DNA Nanotechnology Based on i–Motif Structures / Y. Dong, Z. Yang, D. Liu // Acc. Chem. Res. – 2014. – Vol. 47. – P. 1853–1860.

230. Ravanat, J.–L. Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components / J.–L. Ravanat, T. Douki, J. Cadet // J. Photochem. Photobiol. B. – 2001. – Vol. 63. – P. 88–102.

231. Douki, T. Effect of denaturation on the photochemistry of pyrimidine bases in isolated DNA / T. Douki // J. Photochem. Photobiol. B. – 2006. – Vol. 82. – P. 45–52.

232. Callis, P. R. Electronic States and Luminescence of Nucleic Acid Systems / P. R. Callis // Annu. Rev. Phys. Chem. – 1983. – Vol. 34. – P. 329–357.

233. Cohen, B. Ultrafast excited–state dynamics of RNA and DNA C tracts / B. Cohen, M. H. Larson, B. Kohler // Chem. Phys. – 2008. – Vol. 350. – P. 165–174.

234. Keane, P. M. Long–lived excited states in i–motif DNA studied by picosecond time–resolved IR spectroscopy / P. M. Keane [et al.] // Chem Commun. – 2014. – Vol. 50. – P. 2990–2992.

235. Keane, P. M. Long–Lived Excited–State Dynamics of i–Motif Structures Probed by Time–Resolved Infrared Spectroscopy / P. M. Keane [et al.] // ChemPhysChem. – 2016. – Vol. 17. – P. 1281–1287.

236. Birks, J. B. Photophysics of Aromatic Molecules / J. B. Birks. – Wiley-Interscience, 1970.

237. Olaso–González, G. The Role of Adenine Excimers in the Photophysics of Oligonucleotides / G. Olaso–González, M. Merchán, L. Serrano–Andrés // J. Am. Chem. Soc. – 2009. – Vol. 131. – P. 4368–4377.

238. Serrano–Pérez, J. J. Theoretical Insight into the Intrinsic Ultrafast Formation of Cyclobutane Pyrimidine Dimers in UV–Irradiated DNA: Thymine versus Cytosine / J. J. Serrano–Pérez [et al.] // J. Phys. Chem. B. – 2008. – Vol. 112. – P. 14096–14098.

239. Plessow, R. Intrinsic Time– and Wavelength–Resolved Fluorescence of Oligonucleotides: A Systematic Investigation Using a Novel Picosecond Laser Approach / R. Plessow [et al.] // J. Phys. Chem. B. – 2000. – Vol. 104. – P. 3695–3704.

240. Borrego–Varillas, R. Exciton Trapping Dynamics in DNA Multimers / R. Borrego–Varillas, G. Cerullo, D. Markovitsi // J. Phys. Chem. Lett. – 2019. – Vol. 10. – P. 1639–1643.

241. Georghiou, S. Singlet–singlet energy transfer along the helix of a double–

stranded nucleic acid at room temperature / S. Georghiou [et al.] // J. Biomol. Struct. Dyn. – 1990. – Vol. 8. – P. 657–674.

242. Fredericq, E. Study of the interaction of DNA and acridine orange by various optical methods / E. Fredericq, C. Houssier // Biopolymers. – 1972. – Vol. 11. – P. 2281–2308.

243. Armstrong, R.W. The interaction between acridine dyes and deoxyribonucleic acid / R.W. Armstrong, T. Kurucsev, U.P. Strauss // J. Am. Chem. Soc. – 1970. – Vol. 92. – P. 3174–3181.

244. Robinson, B.H. Thermodynamic behaviour of acridine orange in solution. Model system for studying stacking and charge–effects on self–aggregation / B.H. Robinson, A. Löffler, and G. Schwarz // J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1 Phys. Chem. Condens. Phases. – 1973. – Vol. 69. – P. 56–69.

245. Bonačić–Koutecký, V. An accurate relativistic effective core potential for excited states of Ag atom: An application for studying the absorption spectra of Ag n and Ag n+ clusters / V. Bonačić–Koutecký [et al.] // The Journal of chemical physics. – 1999. – Vol. 110 (8). – P. 3876–3886.

246. Díez, I. On heterogeneity in fluorescent few–atom silver nanoclusters / I. Díez [et al.] // Physical Chemistry Chemical Physics. – 2013. – Vol. 15 (3). – P. 979–985.

247. Richards, C. I. Oligonucleotide–stabilized Ag nanocluster fluorophores / C. I. Richards [et al.] // Journal of the American Chemical Society. – 2008. – Vol. 130 (15). – P. 5038–5039.

248. Shah, P. Design aspects of bright red emissive silver nanoclusters/DNA probes for microRNA detection / P. Shah [et al.] // Acs Nano. – 2012. – Vol. 6 (10). – P. 8803–8814.

249. Ritchie, C. M. Ag nanocluster formation using a cytosine oligonucleotide template / C. M. Ritchie [et al.] // The Journal of Physical Chemistry C. – 2007. – Vol. 111 (1). – P. 175–181.

250. Karimova, N. V. Time–dependent density functional theory investigation of the electronic structure and chiroptical properties of curved and helical silver nanowires / N. V. Karimova, C. M. Aikens // The Journal of Physical Chemistry A. – 2015. – Vol. 119

(29). – P. 8163–8173.

251. Vdovichev, A. A. Structural model of gold and silver fluorescent clusters / A. A. Vdovichev, R. R. Ramazanov, A. I. Kononov // Computer Research and Modeling. – 2015. – Vol. 7 (2). – P. 263–269.

252. Kummer, K. Electronic structure of genomic DNA: A photoemission and X–ray absorption study / K. Kummer [et al.] // The Journal of Physical Chemistry B. – 2010. – Vol. 114 (29). – P. 9645–9652.

253. Daune, M. Complexes of silver ion with natural and synthetic polynucleotides / M. Daune, C. A. Dekker, H. K. Schachman // Biopolymers: Original Research on Biomolecules. – 1966. – Vol. 4 (1). – P. 51–76.

254. Shukla, S. Probing differential Ag+–nucleobase interactions with isothermal titration calorimetry (ITC): Towards patterned DNA metallization / S. Shukla, M. Sastry // Nanoscale. – 2009. – Vol. 1 (1). – P. 122–127.

255. Li, W. Effects of polymorphic DNA on the fluorescent properties of silver nanoclusters / W. Li [et al.] // Photochemical & Photobiological Sciences. – 2013. – Vol. 12 (10). – P. 1864–1872.

256. Yamane, T. On the complexing of deoxyribonucleic acid by silver (I) / T. Yamane, N. Davidson // Biochimica et biophysica acta. – 1962. – Vol. 55 (5). – P. 609–621.

257. Widengren, J. Fluorescence–based transient state monitoring for biomolecular spectroscopy and imaging / J. Widengren // Journal of The Royal Society Interface. – 2010. – Vol. 7 (49). – P. 1135−1144.

258. Richards, C. I. Optically modulated fluorophores for selective fluorescence signal recovery / C. I. Richards [et al.] // J. Amer. Chem. Soc. – 2009. – Vol. 131 (13). – P. 4619–4621.

259. Petty, J. T. DNA–templated molecular silver fluorophores / J. T. Petty [et al.] // J. Phys. Chem. Lett. – 2013. – Vol. 4. – P. 1148−1155.

260. Birge, R. R. Kodak laser dyes / R. R. Birge [et al.] – Eastman Kodak Company, Rochester, NY, 1987.

261. Stracke, F. Singlet molecular oxygen photosensitized by Rhodamine dyes: correlation with photophysical properties of the sensitizers / F. Stracke, M. Heupel, E. Thiel // J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry. – 1999. – Vol. 126 (1–3). – P. 51–58.

262. Gregor, I. Precise fluorescence measurement for determination of photophysical properties of dyes / I. Gregor, M. Heupel, E. Thiel // Chem. Phys. – 2001. – Vol. 272 (2–3). – P. 185–197.

263. Gazeau, M. C. New experimental method for determining the S1→ Sn absorption spectrum of highly fluorescent dyes / M. C. Gazeau [et al.] // Canadian journal of physics. – 1993. – Vol. 71 (1–2). – P. 59–65.

264. Eggeling, C. Molecular Photobleaching Kinetics of Rhodamine 6G by One– and Two–Photon Induced Confocal Fluorescence Microscopy / C. Eggeling, A. Volkmer, C. A. M. Seidel // ChemPhysChem. – 2005. – Vol. 6. – P. 791–804.

265. Eggeling, C. Photobleaching of Fluorescent Dyes under Conditions Used for Single–Molecule Detection: Evidence of Two–Step Photolysis / C. Eggeling [et al.] // Anal. Chem. – 1998. – Vol. 70. – P. 2651–2659.

266. Reindl, S. Higher Excited–State Triplet–Singlet Intersystem Crossing of Some Organic Dyes / S. Reindl, A. Penzkofer // Chem. Phys. – 1996. – Vol. 211. – P. 431–439.

267. Kibbe, W. A. OligoCalc: An online oligonucleotide properties calculator / W. A. Kibbe // Nucleic Acids Res. – 2007. – vol. 35. – P. W43–W46.

268. Gwinn, E. DNA–Protected Silver Clusters for Nanophotonics / E. Gwinn [et al.] // Nanomaterials. – 2015. – Vol. 5. – P. 180–207.

269. Leggett, A. J. Dynamics of the dissipative two–state system / A. J. Leggett [et al.] // Rev. Mod. Phys. – 1987. – Vol. 59. – P. 1–85.

270. Czader, A. Calculations of the exciton coupling elements between the DNA bases using the transition density cube method / A. Czader, E. R. Bittner // J. Chem. Phys. – 2008. – Vol. 128. – P. 35101.

271. Lakowicz, J. R. Principles of Fluorescence Spectroscopy / J. R. Lakowicz. – 3rd edn. – Springer International Publishing, 2006.

САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

На правах рукописи

Кононов Алексей Игоревич

ЭЛЕКТРОННО-ВОЗБУЖДЕННЫЕ СОСТОЯНИЯ ДНК И КОМПЛЕКСОВ ДНК С НАНОКЛАСТЕРАМИ СЕРЕБРА

(Перевод с английского)

Специальность 01.04.07 – физика конденсированного состояния

Диссертация на соискание ученой степени
доктора физико-математических наук

Санкт-Петербург – 2020

Памяти моей мамы,
Марии Алексеевны Кононовой,
посвящается

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ……...……...…186
ГЛАВА 1. ФОТОФИЗИКА НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ И ИХ КОМПЛЕКСОВ С КРАСИТЕЛЯМИ И КЛАСТЕРАМИ МЕТАЛЛОВ (литературный обзор)…….....198
1.1. Фотопроцессы в ДНК……...…..198
1.2. Структура и фотофизические особенности комплексов ДНК с кластерами серебра……..216
ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ И ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ.....228
2.1. Образцы……...…….228
2.2. Экспериментальные методы…….…..230
2.3. Теоретические методы……238
ГЛАВА 3. НИЗКО-ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЕ ЭЛЕКТРОННО-ВОЗБУЖДЕННЫЕ СОСТОЯНИЯ В ДНК.…….242
3.1. Расчеты спектров электронного возбуждения мономеров ДНК и димеров в В-форме ДНК…….242
3.2. Анализ влияния конформации на спектры возбуждения стэкинг-димеров тимина……244
3.3. Спектры возбуждения димеров аденина и цитозина в неканонических конформациях……....251
3.4. Природа низко-энергетических состояний……...…254
3.5. Параметр эффективности взаимодействия с солнечной радиацией для димеров в неканонических структурных формах и горячие точки образования фотодимеров в ДНК…….259
3.6. Спектры поглощения структуры i-motif ДНК……..264
3.7. Выводы к главе 3…….271
ГЛАВА 4. ДИНАМИКА ЭЛЕКТРОННО-ВОЗБУЖДЕННЫХ СОСТОЯНИЙ В РАЗЛИЧНЫХ СТРУКТУРАХ ДНК……..272
4.1. Стационарная люминесценция и кинетика люминесценции

различных форм цитозиновых цепочек ДНК……..272
4.2. Кинетика люминесценции высокомолекулярной ДНК……...282
4.3. Перенос энергии в ДНК……..284
4.4. Выводы к главе 4…….289
ГЛАВА 5. СТРУКТУРА КОМПЛЕКСОВ ДНК С КЛАСТЕРАМИ СЕРЕБРА. ЭЛЕКТРОННО-ВОЗБУЖДЕННЫЕ СОСТОЯНИЯ КОМПЛЕКСОВ……...291
5.1. Структуры свободных кластеров серебра и их электронные спектры возбуждения……....291
5.2. Структуры кластеров в комплексах с 12-мерной ДНК и их электронные спектры возбуждения…….295
5.3. Комплексы ионов серебра и кластеров с 15-мерным олигонуклеотидом……..308
5.4. Выводы к главе 5. ……..316
ГЛАВА 6. ДИНАМИКА ЭЛЕКТРОННО-ВОЗБУЖДЕННЫХ СОСТОЯНИЙ В КОМПЛЕКСАХ ДНК С КЛАСТЕРАМИ СЕРЕБРА…….....317
6.1. Образование темновых состояний в комплексах…….317
6.2. Перенос энергии в комплексах ДНК с кластерами серебра……...330
6.3. Динамика флуоресцентного возбужденного состояния комплекса Ag-DNA……343
6.4. Выводы к главе 6……348
ЗАКЛЮЧЕНИЕ……....350
БЛАГОДАРНОСТИ……....351
ЛИТЕРАТУРА……352

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность и степень разработанности. Жизнедеятельность живых систем в условиях солнечной радиации обуславливает громадный интерес к фотонике биологических молекул. Природой в процессе эволюции были созданы уникальные молекулярные системы, эффективно взаимодействующие с солнечным излучением, такие как, например, сетчатка глаза животных, светособирающая антенна фотосинтетических реакционных центров растений и бактерий, в которых функциональными молекулами являются поглощающие свет пигменты. Понимание физики квантовых процессов взаимодействия света с биомолекулами чрезвычайно важно не только с академической, но и с практической точки зрения, как для современной биомедицины, так и для быстро развивающейся отрасли биоинспирированного материаловедения. Современные исследования показывают, что квантовые когерентные эффекты играют определяющую роль в успешном функционировании этих природных систем [1]. Ярким примером квантово-механических эффектов в живых системах является когерентная передача электронного возбуждения в процессе фотосинтеза. Природа в процессе эволюции создала чрезвычайно эффективную свето-собирающую систему, демонстрирующую уникальные квантовые когерентные свойства, обеспечивающие направленный транспорт энергии возбуждения к реакционному центру фотосинтетических систем [2]. Более примитивные фотосистемы могли, однако, появиться уже на ранних стадиях эволюции. В условиях интенсивной ультрафиолетовой (УФ) радиации нуклеиновые кислоты (НК) могли использоваться в качестве светособирающих молекулярных антенн в фотохимических процессах, происходящих в пребиотическую эпоху на земле [3, 4].

Рис. 1. Схематичное изображение двойной спирали ДНК.

Азотистые основания в спиралях НК (рис. 1) также упорядочены как и пигменты в фотосинтетических системах. Также как и в антеннах фотосистем, поглощение фотона в НК носит экситонный характер, что отчетливо проявляется в спектрах кругового дихроизма (КД) [5]. Экситон в структуре упорядоченных хромофоров означает делокализацию возбуждения. Основы молекулярных экситонов в агрегатах красителей были изложены Каша с соавторами [6], применившими теорию молекулярных экситонов Френкеля для кристаллов, разработанную Давыдовым [7]. Спираль ДНК, как пример природной системы с π–π стэкинг взаимодействием, широко рассматривается как структура, в которой возможен эффективный перенос заряда [8-10] и энергии возбуждения [11-13]. Экситонный и зарядовый транспорт в ДНК имеет большое значение, прежде всего, для понимания механизмов и путей фотохимических реакций в ДНК, приводящих к мутагенезу и канцерогенезу. УФ радиация способна вызывать различные повреждения ДНК и РНК: фотодимеризацию, фотомодификацию, сшивки и фотоокисление [14, 15]. Циклобутановые пиримидиновые димеры (CPD) являются наиболее опасным повреждением, вызывающим рак кожи [16, 17]. Повреждения, вызванные УФ облучением [18] и ионизирующей радиацией [19], распределяются в ДНК неравномерно, и миграция энергии рассматривается как возможная причина наблюдаемых эффектов избирательного воздействия

излучения. Экситонные состояния в ДНК могут увеличивать эффективность транспорта энергии электронного возбуждения по цепочке азотистых оснований аналогично тому, как это имеет место в природных системах фотосинтеза. При этом сайты, выступающие в роли акцепторов, должны обладать низколежащими электронно-возбужденными состояниями (ЭВС), на которые возможен перенос энергии с других участков ДНК. Энергия возбуждения, таким образом, локализуется на участках спирали ДНК с низколежащими ЭВС, где и происходят дальнейшие фотохимические реакции. Возбуждение данных участков может происходить и в результате непосредственного поглощения ими квантов солнечной радиации. При этом число поглощенных квантов сайтами с низкоэнергетическими ЭВС может оказаться значительно больше по сравнению с другими участками ДНК, поскольку интенсивность солнечной радиации у земной поверхности экспоненциально возрастает с уменьшением энергии кванта (рис. 2), а поглощение основных форм НК резко уменьшается. Данная гипотеза наглядно подтверждается спектром действия образования CPD, который отличается от спектра поглощения ДНК, обнаруживая значительную интенсивность в районе 300 нм, где поглощение ДНК, напротив, очень мало (рис. 2). Этот факт означает наличие в ДНК структур с большим квантовым выходом образования димеров и заметным сечением поглощения в области 300 нм, поскольку эффективность димеризации определяется произведением квантового выхода и поглощения. Разностный спектр, показанный на рис. 2, указывает на то, что наиболее подверженные димеризации структуры (*hot spots*) обладают низкоэнергетическими электронно-возбужденными состояниями (ЭВС) в области 290-300 нм, сдвинутыми в длинноволновую часть спектра на 0.4-0.5 эВ относительно максимума поглощения ДНК на 260 нм.

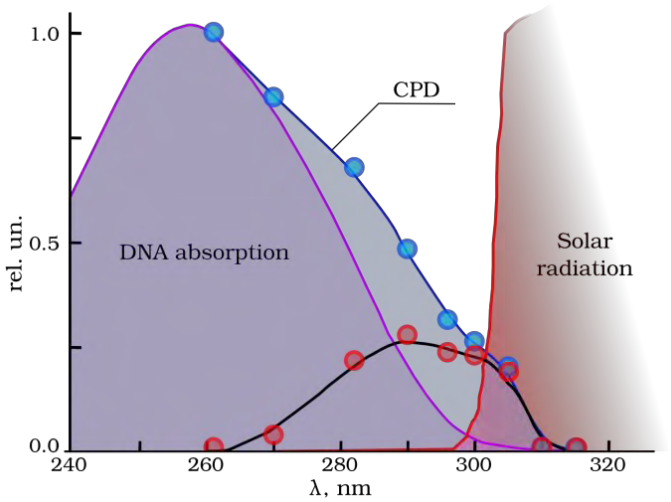


Рис. 2. Спектры поглощения геномной ДНК [20] и солнечного УФ излучения у поверхности земли [21], спектр действия образования циклобутановых пиримидиновых димеров (CPD) [22] и разностный спектр между спектром действия и спектром поглощения.

Таким образом, сайты с низкоэнергетическими ЭВС являются, вероятно, наиболее чувствительными к действию солнечной радиации как за счет более эффективного прямого поглощения ими квантов солнечной радиации, так и за счет возможного переноса на них энергии возбуждения по спирали ДНК. Выяснение природы низкоэнергетических ЭВС ДНК в области 300 нм является ключевым фактором для последующей идентификации *hot spots* (горячих точек) фотохимических реакций в ДНК. Немаловажными являются также вопросы, связанные с определением радиуса переноса энергии в НК и поиском лигандов, выполняющих роль акцепторов энергии возбуждения и являющихся эффективными десенсибилизаторами негативного воздействия солнечной радиации. Несмотря на достаточно большое количество экспериментальных данных, вопросы, связанные с природой низкоэнергетических ЭВС, диапазоном делокализации возбуждения и эффективностью миграции энергии в НК, остаются дискуссионными.

Спектры возбуждения стэкинг-димеров азотистых оснований НК в канонических структурных формах, рассчитываемые с помощью современных

квантово-химических *ab initio* методов высокого уровня, не показывают наличие заметно смещенных в длинноволновую сторону ЭВС, за исключением небольшого ~0.1 эВ экситонного расщепления мономерных состояний [23-28]. В клетках живых организмов НК действительно находятся в основном в канонических структурных формах. Однако, различные неканонические структуры также наблюдаются в НК, определяемые как мономерной последовательностью, так и локальным окружением и взаимодействиями с другими биомолекулами и лигандами [29]. Искривленные спирали НК могут содержать участки с большой вариативностью структурных параметров стэкинга. Необычная стэкинг-геометрия таких сайтов может приводить к большему π–электронному перекрыванию, и как следствие, значительному изменению спектров возбуждения, увеличению экситонного расщепления и появлению низкоэнергетических ЭВС.

В современных условиях интенсивных техногенных процессов, разрушающих озоновый слой и приводящих к увеличению интенсивности УФ света вблизи поверхности земли, фактор мутагенного и канцерогенного действия солнечной радиации на организм человека способствует существенному увеличению риска онкогенных заболеваний. Необходимость для современной медицины разработки эффективной защиты от вредных воздействий солнечного УФ света на молекулярном уровне определяет фундаментальный и практический интерес к фотонике НК и **актуальность** данной диссертационной работы.

С другой стороны, ее **актуальность** обусловлена потребностями быстро развивающегося направления биоинспирированных наноматериалов, в частности, наноструктур на основе молекул ДНК. С технологической точки зрения, свойства ЭВС и процессы миграции заряда и возбуждения в НК представляют большой интерес для разработки искусственных наноконструкций на основе НК. Полимерные молекулы являются уникальным материалом при создании различных нано- и микроструктур. Эта уникальность основана на их способности к самоорганизации в растворе и на межфазных границах, приводящей к упорядоченности сегментов макромолекул [30, 31]. Специфичность Уотсон-

Криковских пар ДНК, образованных водородными связями, а также взаимодействие с ионами металлов, позволяет программировать пространственную конфигурацию создаваемых конструкций на основе ДНК [32-34]. Оптические свойства наноструктур на основе ДНК представляют повышенный интерес при создании материалов для оптических элементов, оптоэлектроники, фотоники, лазерных активных сред, фотогальваники, элементов оптических логических устройств, химических и биосенсоров, медицинской и биодиагностики, фототерапии. В качестве функциональных молекул, стабилизированных ДНК-матрицей, при этом широко рассматриваются органические красители, наночастицы и нанокластеры металлов, взаимодействующие с электромагнитным излучением в широкой области от УФ до ИК диапазона, обладающие способностью к люминесценции, фотосенсибилизации и передачи энергии возбуждения [35-44]. Люминесцирующие нанокластеры металлов, стабилизированные полимерами, в частности, ДНК, в последние годы привлекают повышенный интерес, связанный с их широким потенциалом применения в качестве биосенсоров, химических сенсоров, люминесцентных маркеров для биоимиджинга [43, 44]. Между тем, вопросы, связанные со структурой кластеров и природой их ЭВС остаются во многом не раскрытыми.

Цели, поставленные в данной работе, заключались в установлении природы низколежащих ЭВС ДНК и комплексов ДНК с кластерами серебра, а также основных происходящих в них процессов.

Для достижения поставленных целей в работе решались следующие **основные задачи**:

1. Изучение конформационной зависимости электронных спектров возбуждения и природы ЭВС ДНК, рассчитываемых методами *ab initio* высокого уровня; идентификация структур с низколежащими ЭВС в УФ области спектра солнечной радиации.

2. Изучение конформационной зависимости динамики электронного возбуждения в цитозиновых цепочках ДНК.

3. Определение структуры и фотофизических особенностей комплексов ДНК с флуоресцирующими кластерами серебра.

4. Определение радиуса и механизмов миграции энергии электронного возбуждения в комплексах ДНК с красителями и нанокластерами серебра.

5. Изучение основных фотопроцессов в комплексах кластеров с ДНК (природа Стоксова сдвига кластеров и образование темновых состояний кластеров).

Научная новизна:

1. Показана определяющая роль экситонного взаимодействия в процессах взаимодействия солнечной радиации с ДНК.

2. Предложена структурная модель *hot spots* фотохимического повреждения ДНК и образования CPD.

3. Изучена динамика электронного возбуждения в структурах i-мотива и односпиральной формы цитозиновой ДНК на фемтосекундной временной шкале.

4. Показано наличие долгоживущего делокализованного (экситонного) состояния в i-мотиве.

5. Обнаружена эффективная миграция энергии электронного возбуждения в комплексах олигонуклеотидов, а также природной ДНК с нанокластерами серебра.

6. Экспериментально обоснован экситонный механизм в процессе эффективной миграции энергии в комплексах ДНК с кластерами.

7. Предложена структурная модель флуоресцирующих кластеров серебра, стабилизированных ДНК.

8. Разработана методика применения флуоресцентной спектроскопии насыщения для определения фотофизических констант люминесцирующих кластеров серебра в гетерогенных растворах.

9. Изучена динамика электронного возбуждения кластеров на фемтосекундной временной шкале.

Теоретическая значимость. Полученные в работе данные могут быть использованы для дальнейшего развития теоретических моделей переноса энергии электронного возбуждения в упорядоченных структурах хромофоров, а также физических моделей металлических кластеров и их комплексов с лигандами.

Практическая значимость. Предложенная структурная модель *hot spots* фотохимического повреждения НК и образования CPD в ДНК служит необходимым базисом для определения сайтов в ДНК и структур НК потенциально уязвимых для действия солнечной радиации и дальнейшей разработки возможных фотопротекторов, снижающих риск онкогенных заболеваний. Нанокластеры серебра, являющиеся эффективными акцепторами энергии возбуждения в комплексах с ДНК, могут рассматриваться как потенциальные десенсибилизаторы негативного воздействия УФ облучения. Данные о структуре и фотофизических процессах в комплексах кластеров серебра с ДНК, полученные в данной работе, также могут быть использованы при разработке флуоресцентных зондов для биоимиджинга, химических и биосенсоров, конверторов УФ света и фотовольтаических ячеек на их основе. Развитый метод спектроскопии флуоресцентного насыщения может быть использован для определения сечений поглощения и других фотофизических констант люминесцирующих молекул в сложных гетерогенных растворах.

Методология и методы исследования. Поскольку исследуемые системы в высокой степени гетерогенны, основным методом используемым в работе для исследования ЭВС ДНК и их комплексов с нанокластерами серебра и красителями был метод флуоресцентной спектроскопии, включающий как стационарную, так и временную спектроскопию, обеспечивающие необходимую селективность за счет различия квантовых выходов или времен жизни компонент. Исследование миграции энергии в комплексах кластеров серебра с ДНК требовало знание структуры комплексов и их фотофизических констант. Структура ДНК-матрицы

определялась с использованием спектральных методов, в том числе масс-спектрометрии. Детальная структура комплекса определялась путем моделирования спектров возбуждения и поляризации флуоресценции комплексов методами квантовой химии и молекулярной динамики. Фотофизические параметры кластеров определялись комплексным использованием методов флуоресцентной спектроскопии насыщения и временной спектроскопии. Для получения гомогенных растворов кластеров использовались методы высокоэффективной жидкостной хроматографии. Исследование влияния конформации стэкинга на ЭВС было проведено методами квантовой химии и молекулярной динамики с использованием структурных параметров, имеющихся в доступных базах данных НК.

Положения, выносимые на защиту:

I. Наличие структур ДНК с низколежащими ЭВС подтверждается расчетами спектров возбуждения стэкинг-димеров оснований**.** Стэкинг-структуры азотистых оснований с геометрией, определяемой расстоянием между серединами связей C5-C6 $\lesssim$ 3.3Å и дигедральным углом C5-C6-C6-C5 $\lesssim$ 50° обнаруживают низколежащие ЭВС экситонной природы в области 300 нм спектра возбуждения НК. Эти структуры являются наиболее эффективными центрами (*hot spots*), взаимодействующими с земной солнечной радиацией, интенсивность которой резко возрастает в области длин волн >300 нм.

II. В форме i-motif ДНК спектр поглощения значительно смещен в красную область за счет экситонного взаимодействия оснований. Экситонное состояние является относительно долгоживущим с временем жизни порядка нескольких пикосекунд.

III. Люминесцирующие кластеры серебра, стабилизированные ДНК, имеют протяженную форму, реализуемую в комплексе кластера с дуплексом или шпилькой.

IV. Для комплексов ДНК с кластерами серебра, являющимися акцепторами возбуждения, возможен эффективный перенос электронного возбуждения с ДНК

на кластер на участке, включающем около 30 азотистых оснований, вдоль спирали за время $\lesssim 100$ фс. Механизм переноса предполагает делокализацию электронного возбуждения (когерентный экситон) в области размером около 5 азотистых оснований в одиночной спирали ДНК.

V. Комплексы кластеров серебра с ДНК могут обладать высоким квантовым выходом долгоживущего темнового состояния.

VI. Величина Стоксова сдвига люминесценции кластеров в основном определяется перестройкой структуры кластера в возбужденном состоянии за время <100 фс.

Апробация работы. Материалы диссертации докладывались на следующих **конференциях**:

Biophysical Society 56th Annual Meeting, San-Diego, California, USA, 2012.

“Quantitative imaging and spectroscopy in neuroscience” (QISIN), St. Petersburg, Russia, 2012.

3-d International School on Surface Science, Khosta (Sochi) Russia, 2013.

16th International congress on photobiology, Córdoba, Argentina, 2014. XII International Conference on Nanostructured Materials (NANO 2014), Moscow, Russia, 2014.

ESP 2015 Congress, Aveiro, Portugal, 2015.

Berlin-St. Petersburg Workshop on Structure and Dynamics of Nanoscopic Matter, Freie Universität Berlin, Germany, 2015.

International School and Conference "Saint Petersburg OPEN 2016", St. Petersburg, Russia, 2016.

ASP Conference 2016, Tampa, USA, 2016.

Фундаментальные химические исследования XXI века, Научная конференция грантодержателей РНФ, Москва, 2016.

8th International IUPAC Symposium «Macro- and Supramolecular Architectures and Materials» (MAM-17), Sochi, Russia, 2017.

ESP 2019 Congress, Barselona, Spain, 2019.

18th IUPAC International Symposium Macromolecular-Metal Complexes, Moscow, Russia, 2019.

4th STEPS Symposium on Photon Science, Tokyo, Japan, 2019.

VI Съезд биофизиков России, Сочи, Россия, 2019.

Достоверность полученных результатов подтверждается использованием широкого набора современных экспериментальных и теоретических методов, согласованностью экспериментальных и теоретических результатов, а также результатами, полученными другими исследователями в данной области.

Основные результаты изложены в 14 **публикациях** в журналах, индексируемых в Web of Science и Scopus [45-58].

Структура диссертации. Диссертация состоит из введения, 6 глав и заключения. Глава 1 представляет собой обзор литературы, посвященный современным представлениям об электронно-возбужденных состояниях ДНК и комплексов ДНК с нанокластерами серебра. В главе 2 описываются основные экспериментальные и теоретические методы. Глава 3 посвящена изучению конформационной зависимости спектров электронного поглощения ДНК. В качестве модельных систем исследуются стэкинг-димеры азотистых оснований в B-форме, а также в различных неканонических структурах, в том числе, в форме i-мотива. Анализируется природа низко-энергетических состояний. В главе 4 изучается динамика электронно-возбужденных состояний на фемтосекундной временной шкале различных форм цитозинового олигонуклеотида, а также природной ДНК. Определяется радиус миграции энергии в комплексах ДНК с красителем. В главе 5 излагаются результаты экспериментально-теоретического подхода к определению структуры комплексов ДНК с ионами и кластерами серебра. Глава 6 посвящена результатам, описывающим динамику фотопроцессов в комплексах ДНК с кластерами. В частности, исследуются образование темновых состояний, перенос энергии и динамический Стоксов сдвиг в комплексах.

Полный объём диссертации составляет 181 страницу со 111 рисунками и 13 таблицами. Список литературы содержит 271 наименование.

ГЛАВА 1. ФОТОФИЗИКА НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ И ИХ КОМПЛЕКСОВ С КРАСИТЕЛЯМИ И КЛАСТЕРАМИ МЕТАЛЛОВ (литературный обзор)

1.1. Фотопроцессы в ДНК.

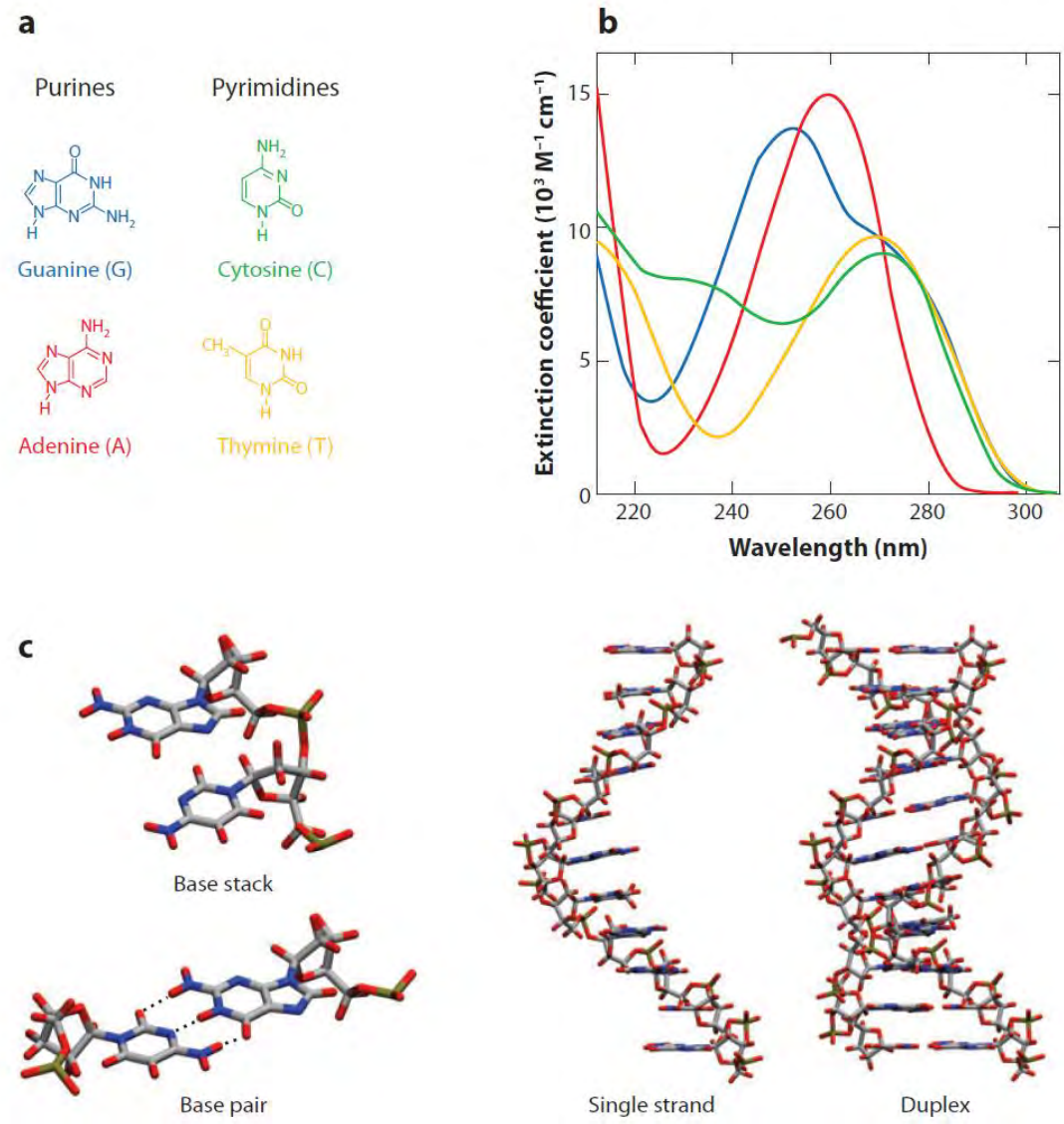


Рис. 1.1.1. Химическая структура (a), УФ-спектры поглощения оснований ДНК (b) и структуры, образованные нуклеиновыми основаниями в ДНК (c) [13].

Поглощение УФ света молекулами ДНК в области УФ солнечного излучения определяется спектральными свойствами азотистых оснований, показанных на

рис. 1.1.1, а также их взаимодействием в стэкинг (стопочных) структурах ДНК. Это взаимодействие хромофоров ДНК обуславливает коллективный (экситонный) характер поглощения УФ квантов. ЭВС системы взаимодействующих хромофоров в случаях слабого и сильного взаимодействия записывается как суперпозиция состояний мономеров [59]:

$$|k\rangle = \sum_{n=1}^{N} \varphi_{kn}|n\rangle \text{ for } k = 1, \dots, N,$$

где φ_{kn} константа, описывающая вклад мономера n в собственное состояние k. В случае димера, экситонные состояния находятся аналитически как:

$$|k\rangle = cos\,\theta\,|1\rangle + sin\,\theta\,|2\rangle, \quad |k'\rangle = cos\,\theta\,|2\rangle - sin\,\theta\,|1\rangle,$$

где $tan\,2\theta = 2\,|J_{12}|\,/(\varepsilon_1 - \varepsilon_2)$, $0 \le \theta < \pi/2$. Разница в энергии состояний (экситонное расщепление):

$$E_k - E_{k'} = \sqrt{(\varepsilon_1 - \varepsilon_2) + 4|J_{12}|^2},$$

где ε_i – энергия i-го мономера в возбужденном состтоянии. J_{12} - взаимодействие мономеров, ответственное за перенос энергии. На рис. 1.1.2 схематично показано экситонное расщепление уровней для димера, образованного двумя азотистыми основаниями (тиминами), показаны также расчетные орбитали соответствующих состояний.

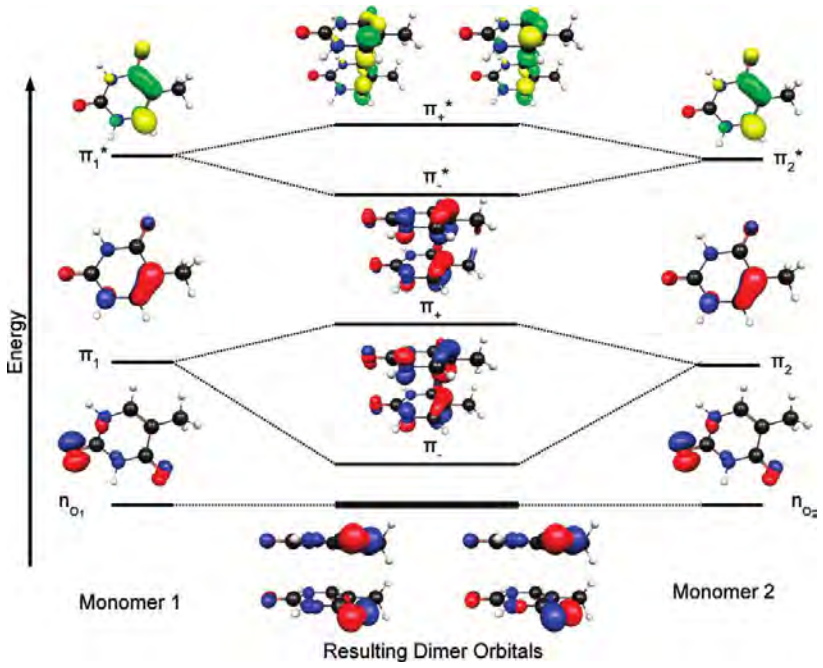


Рис. 1.1.2. Орбитали тиминового мономера n_O, π, π * и полученные в результате орбитали димера тимина. Масштабирование энергии качественное [60].

Из-за коллективного характера возбуждения в молекулярных ансамблях обычная теория передачи энергии Фёрстера не работает в случае экситонных взаимодействий между хромофорами. Для случая сильного взаимодействия скорость передачи энергии определяется обратной величиной резонансного времени жизни экситонного состояния [6]:

$$t = h/(E_k - E_{k'}),$$

где h – постоянная Планка. Расчеты сложной динамики системы взаимодействующих хромофоров должны учитывать энергетический и конформационный беспорядок и все соответствующие вибронные состояния, включая взаимодействие системы с окружением (термостатом). Различные теоретические подходы к динамике возбуждения можно найти в литературе [2, 59, 61-64]. Для примера, на рис. 1.1.3 показана зависимость скорости переноса энергии (релаксации экситона для димера от разницы энергий возбужденных состояний мономеров, расчитанная с использованием различных моделей [59].

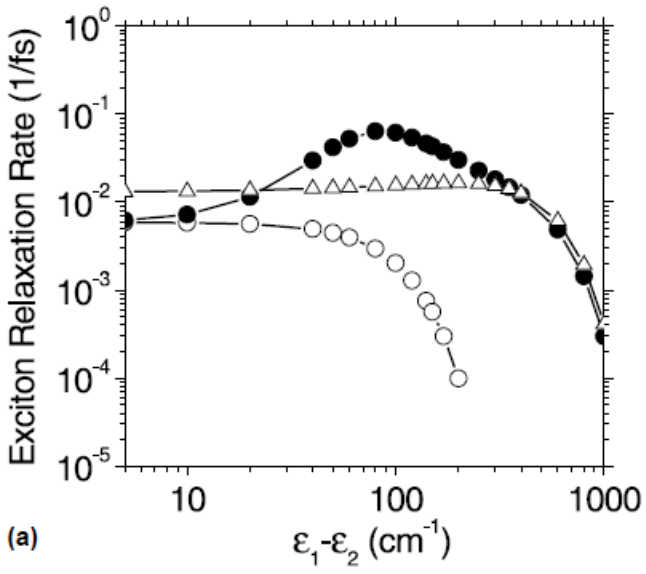


Рис. 1.1.3. Скорости релаксации экситонов как функция энергетической щели двух мономеров, предсказанные моделью Ферстера (открытые треугольники), традиционной моделью Редфилда (открытые круги) и модифицированной моделью Редфилда (сплошные круги), J=100 $см^{-1}$ [59].

В спектрах электронного поглощения ДНК экситонное взаимодействие (расщепление) практически не заметно (случай слабого экситонного взаимодействия) [11]. В отдельных случаях в спектрах возбуждения флуоресценции полимерных цитозиновых и адениновых компонентов НК наблюдались небольшое смещение максимума и длинноволновый хвост по сравнению с мономерными спектрами, что было интерпретировано как проявление экситонного расщепления [65]. Экситонное расщепление хорошо видно в спектрах кругового дихроизма (КД) ДНК (рис. 1.1.4.) [5]. Консервативный спектр КД (две полосы с противоположным знаком) – характерный признак экситонного взаимодействия хромофоров.

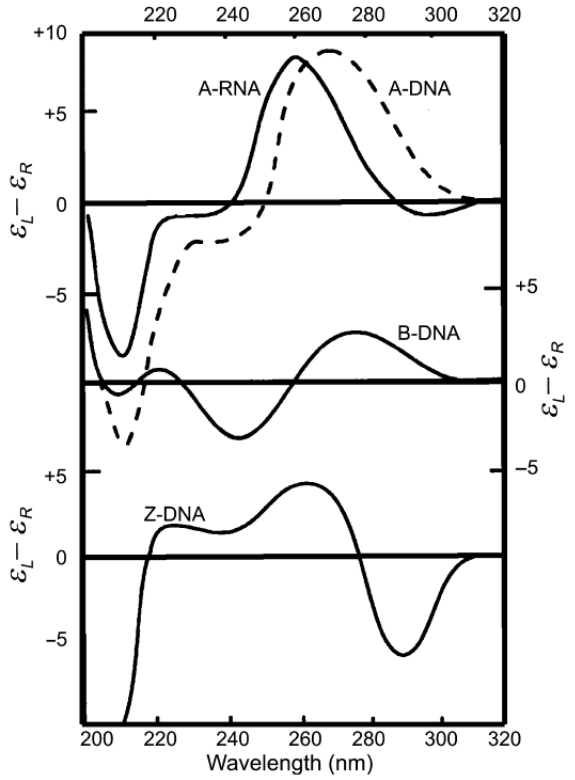


Рис. 1.1.4. Спектры КД для различных форм ДНК [5].

Френкелевские экситоны в ДНК сформированы суперпозицией отдельных возбужденных состояний мономеров. Во многих теоретических работах, использующих различные уровни теории, от полуэмпирических до высокоуровневых *ab-initio* методов, приводятся доказательства экситонных взаимодействий. С обзором этих исследований можно ознакомиться, например, в работе [66]. Полуэмпирические методы предсказывали, что экситонные состояния, рассчитанные для идеальной спиральной геометрии делокализованы по всей длине двойной спирали, состоящей из 20-ти пар оснований [67]. Включение конформационного (недиагонального) разупорядочения, используя структуры, полученные с помощью молекулярной динамики (МД) сокращает пространственную делокализацию до размеров от 4-х до 8-ми пар оснований [68]. Наконец, включение гомогенного уширения (диагонального разупорядочения) в модель еще сильнее уменьшает делокализацию [69, 70]. По рассчетам, почти половина экситонов локализована на единственном основании, остальные, по крайней мере, делокализованы на двух основаниях.

Следует отметить, что эти теоретические подходы имеют дело с возбужденными состояниями Франка-Кондона. Однако вопрос в том, как долго живет экситонное состояние в ДНК. В этом отношении до сих пор нет убедительных экспериментальных доказательств того, что делокализованные состояния сохраняются даже в фемтосекундном масштабе времени, что не удивительно, учитывая небольшие значения расщепления (~ 0,1 эВ) [71] по сравнению с полосой поглощения ДНК с шириной ~ 0,5 эВ. Гомополинуклеотиды являются широко используемыми моделями при изучении динамики возбужденных состояний в ДНК. Однако даже для наиболее хорошо изученных цепей полиадениловой кислоты (poly(dA)) выводы, сделанные относительно первичных фотопроцессов, часто были противоречивыми. Например, Колер с соавт. утверждали, что долгоживущие состояния с переносом заряда (эксимеры) образуются непосредственно из состояния Франка-Кондона [72, 73]. Филипс с соавт. обсуждали динамику возбужденных состояний, уже локализованных на одном основании [74]. Как отмечалось в [13, 73], локализация экситонов в ДНК, скорее всего, происходит быстрее, чем временное разрешение эксперимента (<100 фс). Опираясь на квантово-химические расчеты, Импрота и Бароне показали, что динамика возбужденного состояния в аденинах в стэкинге является сложной, включая локализацию возбуждения на одном основании, образование «нейтральных» и «переносящих заряд» эксимеров, влекущее за собой уменьшение расстояния между основаниями [75]. Эта сложная картина согласуется со сложным многоэкспоненциальным распадом возбужденных состояний, наблюдаемым в полиаденинах [74, 76]. Основываясь на экспериментах накачка-зонд, Фибиг с соавт. предположили, что экситонное состояние, делокализованое на 3-4 основаниях в полиаденинах, релаксирует на пикосекундной шкале [77]. Однако Колер с соавт. опровергли этот результат и объяснили его тем, что он вызван гетерогенностью системы [73].

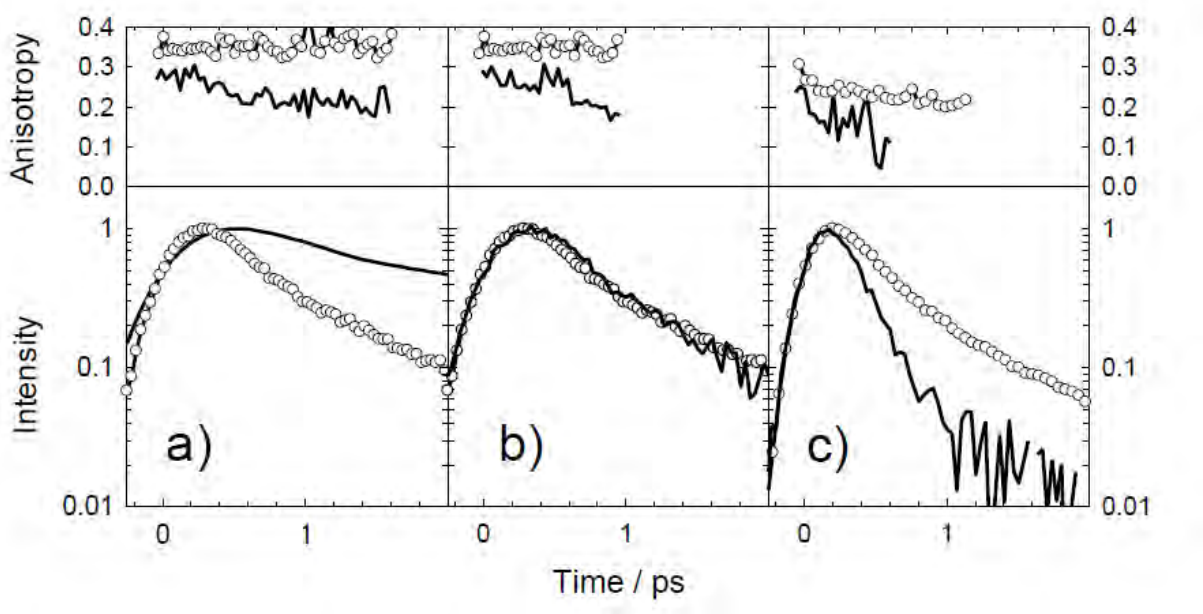


Рис. 1.1.5. Кривые анизотропии флуоресценции (вверху) и затухания флуоресценции (внизу), регистрация на 330 нм для а) poly(dA)·poly(dT), б) poly(dA dT)·poly(dA dT) и в) poly(dCdG)·poly(dCdG) в фосфатном буфере. Также показаны соответствующие кривые для эквимолярной смеси мономеров (кружки) [83].

Густавсон, Марковици и их коллеги первыми провели исследования флюоресценции ДНК олигомеров и полимеров с использованием разрешенной по времени фемтосекундной ап-конверсионной спектроскопии [76, 78-84]. В этих экспериментах были получены временные константы, которые показывали, что тушение флюоресценции происходит на временах не более нескольких пикосекунд. Эксперименты по анизотропии флюоресценции с временным разрешением интерпретировались как быстрая внутренняя конверсия между экситонными состояниями, которые отличаются друг от друга своими поляризационными свойствами (рис. 1,1,5). Например, спад анизотропии флюоресценции для поли-дА:поли-дТ, составляет примерно, 30% через 1 пс после возбуждения. Марковици с соавт. полагали, что более низкое начальное значение анизотропии флуоресценции и ее более быстрое затухание в полимере по сравнению с мономерами предполагает, что часть флуоресценции ДНК происходит из экситонных состояний. С другой стороны, эти особенности

анизотропии можно объяснить сложной динамикой, включающей как быструю (быстрее, чем временное разрешение) локализацию возбуждения так и последующее образование эксимеров.

Основываясь на данных по УФ спектроскопии поглощения и спектрах кругового дихроизма одноцепочечных гомополинуклеотидов, был сделан вывод о том, что длина экситона в нуклеиновых кислотах не превышает пары оснований [65, 85]. Однако, в стабилизированных дуплексах ДНК длина делокализации экситона может быть и больше. Экспериментально это можно было бы обнаружить с помощью нестационарной спектроскопии поглощения на временах меньших времен экситонной локализации. Увеличение выцветания основного состояния из-за экситонной делокализации наблюдалось в фотосинтетических светособирающих системах [86, 87], а также в комплексах красителей с ДНК [88]. Однако, никакого увеличения не наблюдалось для полимерных компонентов нуклеиновых кислот относительно мономеров, по крайней мере, на временах порядка 100 фс (временного разрешения приборов) выцветание (уменьшение поглощения) основного состояния для полимеров было таким же, как и в случае мономеров [72, 73].

Фемтосекундная ап-конверсионная спектроскопия способна лишь частично описать динамику излучательных состояний в ДНК. Люминесценция на временах больших чем 10 пс зачастую слишком слабая для регистрации фемтосекундной спектроскопии. Эксперименты, выполненные с использованием счета фотонов (TCSPC), показали, что малая доля оснований излучает на наносекундной временной шкале [84]. Эти долгоживущие возбужденные состояния имеют характер переноса заряда, что резко снижает скорость излучения. Эксперименты, выполненные с использованием метода накачка-зонд, показывают, что перезаселение основного состояния происходит значительно медленнее в фотовозбужденных молекулах ДНК, чем это предсказывает быстрое падение флюоресценции, наблюдаемое в ап-конверсионной фемтосекундной спектроскопии [72, 89]. Такое разногласие обусловлено тем, что данные методики чувствительны к разным возбужденным состояниям. Френкелевские экситонные

состояния быстро переходят в состояния эксимеров и эксиплексов, которые имеют гораздо более низкую вероятность излучательных переходов. Такие, сравнительно «темновые» состояния, отвечают за излучения на пико и наносекундных временах. Эксперименты, на динуклеотидах [89] окончательно подтверждают гипотезу о том, что экситоны в ДНК быстро переходят в эксиплексы, которые потом релаксируют на пикосекундном временном масштабе за счет перераспределения заряда.

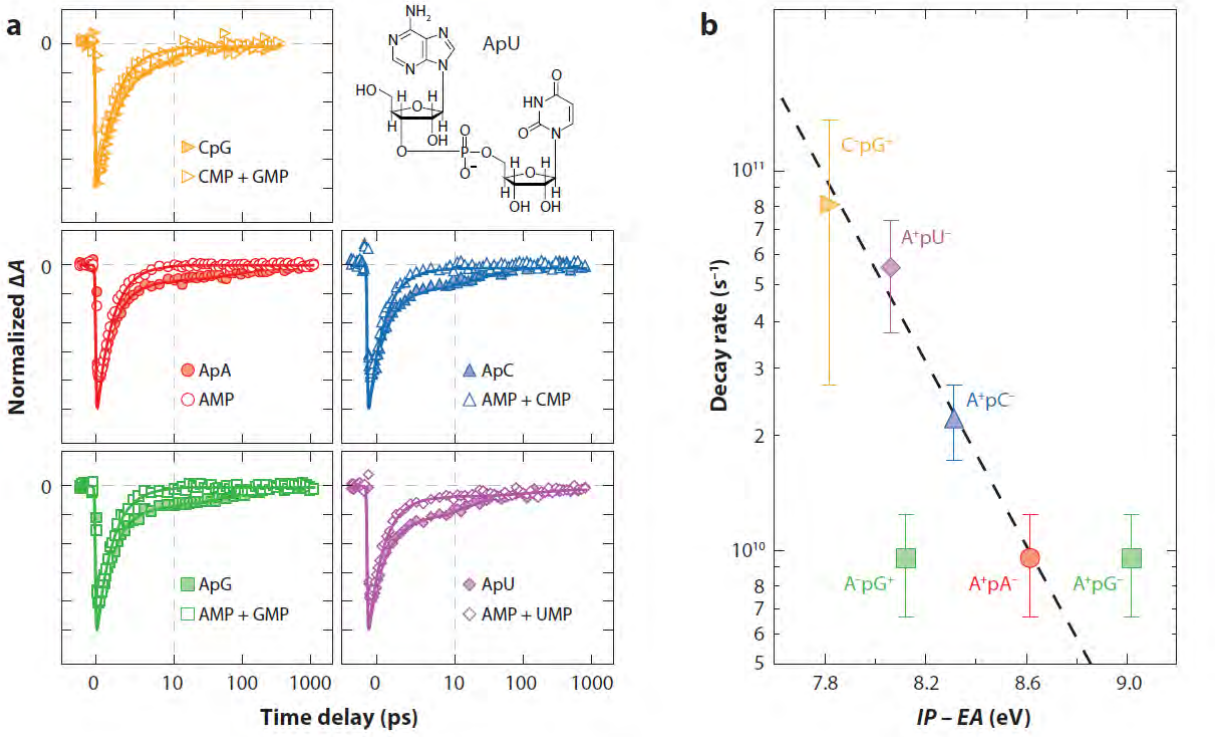


Рис. 1.1.6. Сигналы выцветания (кинетика поглощения) основного состояния для динуклеозидов и эквимолярных смесей их соответствующих мономеров и структура ApU (a). Корреляциямежду скоростью распада долгоживущих состояний динуклеозидов и термодинамической движущей силой для рекомбинации заряда (IP - EA) (b) [13].

Время релаксации долгоживущих сосотояний уменьшается с ростом энергии состояния с переносом заряда, формирующимся за счет переноса электрона с одного основания, находящегося в стэкинге, на другое (рис. 1.1.6). Идентичные

долгоживущие переходы наблюдаются и для димера аденина, и для гомополимеров, содержащих сотни оснований. Это доказывает, что несмотря на длину полимера, появившийся экситон переходит в состояние, в котором возбуждение локализовано на двух основаниях. Однако, на данный момент остается неясной скорость образования эксиплексных состояний и условия их возникновения. Рис. 1.1.7 иллюстрирует имеющиеся на данный момент представления о различных путях релаксации ЭВС в ДНК, указанные выше.

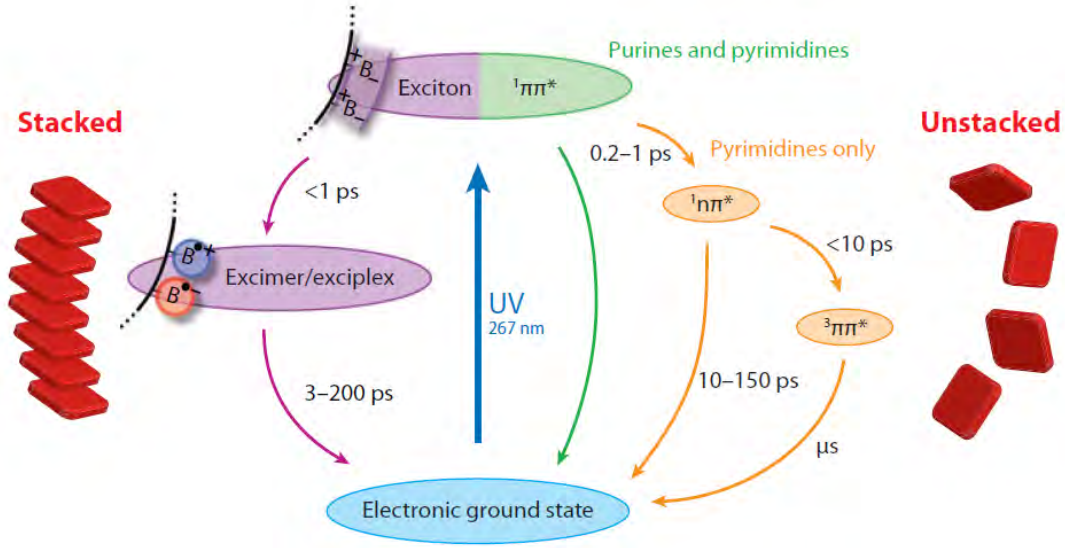


Рис. 1.1.7. Фотопроцессы в ДНК. Слева: Основания, находящиеся в стэкинге, возбуждаются до экситонного состояния, которое распадается до эксиплексного состояния менее чем за 1 пс. Эксиплексное состояние возвращается в основное состояние через 10–100 пс через рекомбинацию заряда. Справа: УФ возбуждение невзаимодействующих оснований создает локализованные состояния, которые переходят в основное состояние в течение 1 пс [13].

Главным мутагенным фотопродуктом в ДНК является циклобутановый пиримидиновый димер (CPD) [14]. В основном этот фотопродукт образуется внутри одной цепочки путем формирования циклобутанового кольца из двойных C5-C6 связей соседних тиминов (рис. 1.1.8).

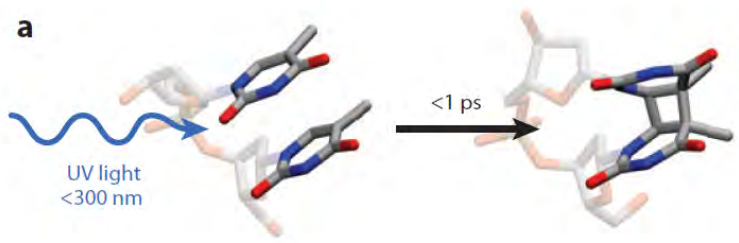


Рис. 1.1.8. Образование димера тимина происходит менее чем за 1 пс для определенных конформаций тиминов [13].

С помощью ИК-спектроскопии с временным разрешением, Шрейер и др. [90] показали, что характерные для цис-син тиминового димера ИК полосы полностью формируются менее чем за 1 пс после возбуждения одноцепочечного тиминового олигомера $(dT)_{18}$. Субпикосекундные времена образования димера указывают на то, что реакция протекает напрямую из $^1\pi\pi^*$ состояния, а также на то, что для димеризации необходимо наличие определенной взаимной ориентации оснований в момент возбуждения. Таким образом, Шрейер и др. [90] предположили, что низкий выход димеризации, наблюдаемый в ДНК, обусловлен тем, что средний угол поворота между основаниями, составляющий в В-форме 36°, не достаточен для фотодимеризации. Узкий диапазон конформаций, необходимых для димеризации, подтверждается исследованиями методами квантовой химии и молекулярной динамики [91-93]. Образование димера за время меньшее 1 пс означает, что динамика ЭВС на фемтосекундной временной шкале является определяющей для последующей фотодимеризации.

Свойства Франк-Кондоновских возбужденных состояний ДНК были предметом обширных квантово-механических (QM) исследований с использованием методов *ab initio* и теории функционала плотности, зависящей от времени (TD DFT) [23-28, 60, 71, 75, 76, 94]. Стэкинг-димеры ДНК, являющиеся основной модельной системой в высокоуровневых *ab initio* вычислениях вертикальных переходов, не демонстрируют переходов заметно смещенных в красную сторону по сравнению с поглощением мономеров, за исключением небольшого экситонного расщепления ~ 0,1 эВ в гомодимерах [23, 25, 27], что

приводит к слабому длинноволновому хвосту [23] относительно спектра мономера. Ни увеличение количества взаимодействующих оснований в одной цепи ДНК, ни спаривание оснований [23, 27] в двойной цепи практически не влияет на расчетную энергию возбуждения нижнего экситонного состояния. Также было показано, что только делокализованные экситонные ππ* состояния вносят вклад в низкоэнергетическую часть спектров поглощения, в то время как переходы с переносом заряда (CT) смещены в коротковолновую сторону относительно максимума поглощения [23-26, 28, 94]. Между тем, значительное отклонение спектров возбуждения флуоресценции некоторых динуклеотидов и олигонуклеотидов от их спектров поглощения в области 290-310 нм [65, 95, 96], длинноволнового хвоста в спектрах поглощения ДНК [20, 97], указывает на возможные электронные переходы в этой области. Поскольку спектры возбуждения позволяют селективную регистрацию различных форм за счет выбора длины волны регистрации, метод позволяет получить спектры электронного возбуждения для различных конформаций, в том числе и редких конформаций с большим квантовым выходом флуоресценции. В наших работах были ранее обнаружены длинноволновые полосы в области 300-320 нм в спектрах возбуждения флуоресценции агрегатов аденозин-монофосфата, (рис. 1.1.10) [98], а также аденилового полинуклеотида (poly-A) при комнатной температуре (рис. 1.1.11) [96].

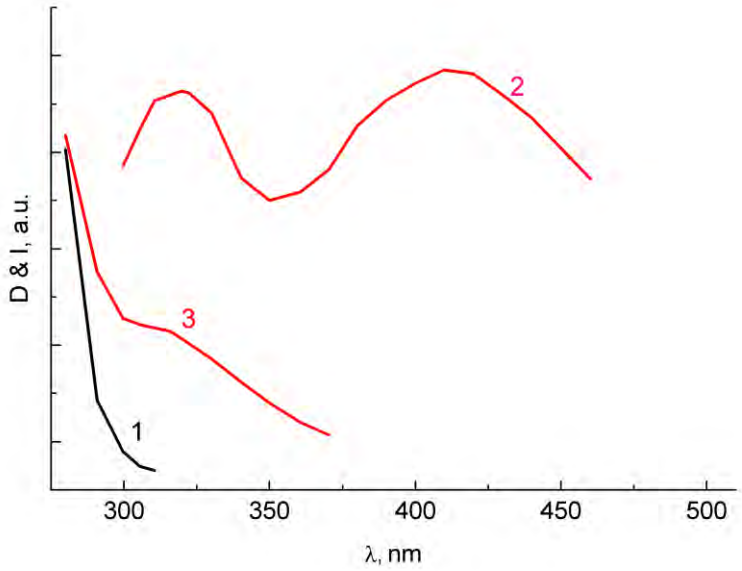


Рис. 1.1.10**.** Спектры поглощения (1), люминесценции (2, $\lambda_в$ = 281 нм) и возбуждения люминесценции (3, $\lambda_р$ = 420 нм) $5 \cdot 10^{-3}$ М аденозин-монофосфата (pH 8) [98].

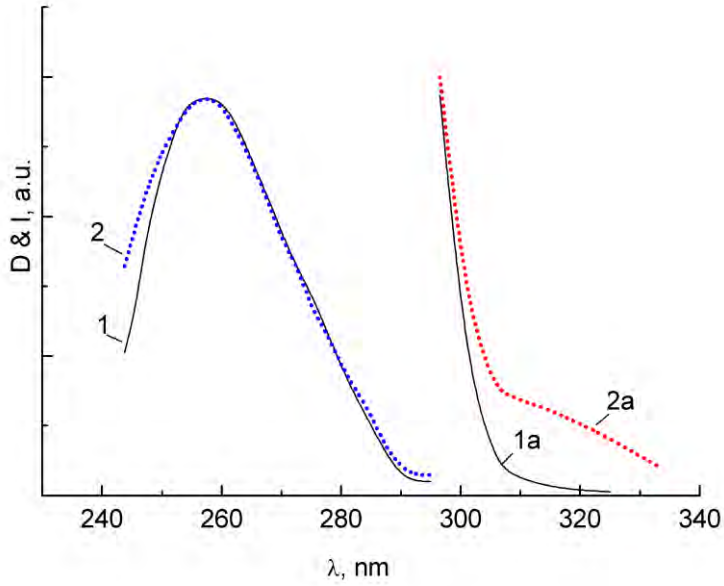


Рис. 1.1.11. Спектры поглощения и возбуждения флуоресценции поли-А при Т=290 К и pH 8: 1 и 2 - поглощение и возбуждение, $c=5 \cdot 10^{-5}$ М, 1а и 2а - поглощение и возбуждение, $c=10^{-3}$ М, $\lambda_р$ = 400 нм [96].

Авторы работы [97] утверждают, что даже в диапазоне УФА выше 330 нм образуются CPD в результате прямого поглощения УФА квантов ДНК. На основании теоретических расчетов с использованием TD DFT, с учетом также эффектов растворителя, было высказано утверждение, что состояния с переносом заряда вносят существенный вклад в длинноволновый хвост поглощения ДНК из-за более высокого неоднородного уширения [75, 93, 99]. Однако, в отличие от TD-DFT, расчеты QM/MM, выполненные для дуплексов ДНК высокоуровневыми *ab initio* методами, показывают, что уширение спектра в основном вызывается внутримолекулярными колебаниями, а CT состояния не влияют на низкоэнергетическую часть спектров [28, 94].

Все теоретические исследования касались канонических форм ДНК, A или B [23, 25, 27], искусственной [24, 60], оптимизированной геометрии стэкинга оснований или геометрии, полученной методом молекулярной динамики (MD) [24, 26, 28, 75, 94] с расстояниями между основаниями, близкими к каноническим формам в спиралях ДНК. В качестве исключения стоит отметить работу [60], где авторы изучали геометрическую зависимость расщепления, а также [24], в которой была исследована зависимость CT-состояний от расстояния в гетеродимерах. В живых организмах ДНК в основном существуют в канонических формах, но также возможно появление некоторых других конформаций, в зависимости от последовательности и локального окружения [29]. ДНК в клетке наматывается вокруг нуклеосом, находясь в частично искаженной конформации относительно B формы. Кроме того, ДНК находится в одноцепочечной форме во время процесса репликации. Необычная геометрия укладки в изогнутых спиралях может усилить перекрытие электронных орбиталей и, таким образом, существенно изменить электронный спектр. Действительно, было показано, что расщепление экситонов очень чувствительно к расстоянию между основаниями и углу поворота (рис. 1.1.12) [60].

Хотя MD моделирование может объяснить низкие квантовые выходы образования CPD редкостью реактивных конформаций [91, 92], MD не может объяснить экспериментально наблюдаемое неслучайное распределение CPDs [18,

100-107] в ДНК и спрогнозировать горячие точки их образования. Спектры действия CPD во многих случаях отличаются от спектра поглощения ДНК, проявляя значительную интенсивность в диапазоне около 300 нм, где поглощение ДНК очень низкое [22, 108, 109] (рис. 1.1.13).

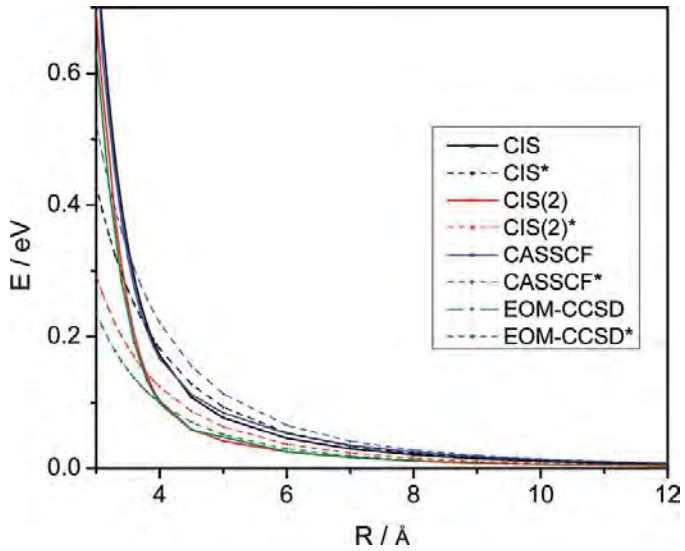


Рис. 1.1.12. Экситонное расщепление в димере тимина как функция межплоскостного расстояния R, рассчитанное различными *ab initio* методами, CIS / cc-pVDZ, CIS (2) / cc-pVDZ, CCSD / 6-31G (d) и CASSCF / 6-31G (d). Результаты, полученные использованием приближения переходного диполя, также показаны пунктирными линиями [60].

Этот факт означает, что незначительная, сильно димеризуемая фракция пиримидиновых оснований в ДНК имеет отличающийся спектр поглощения, поскольку количество CPD является продуктом поглощения и квантовой эффективности. Разница между спектром действия образования CPD для геномной ДНК [22] и спектром поглощения тиминсодержащего олигомера [99] (рис. 1.1.13) предполагает, что фракция димеризуемых пиримидинов имеет электронные переходы в диапазоне 290-300 нм, смещеных в красную сторону от максимума поглощения на величину до 0,5 эВ. Произведение спектра действия (или спектра поглощения) и спектра солнечного излучения является спектром эффективности формирования димеров солнечным излучением, который отражает

скорость образования (или поглощения) CPD на данной длине волны. Спектры эффективности как для основной конформации основного состояния со спектром поглощения, совпадающим со спектром раствора, так и для малой доли со спектром поглощения, совпадающим со спектром действия, представленные на рис. 1.1.13, имеют максимум около 310 нм. Интегральная эффективность, однако, для редкой формы намного выше, чем в случае основной фракции. Таким образом, небольшая доля пиримидинов в стэкинге с электронными переходами на длине волны 300 нм является наиболее чувствительной к солнечному излучению, и эти сайты могут быть «горячими точками» образования CPD под действием солнечного излучения.

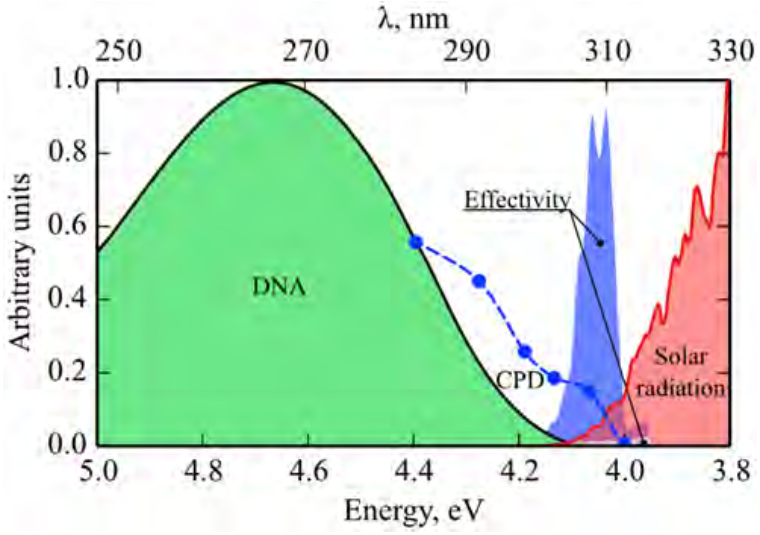


Рис. 1.1.13. Спектр поглощения ДНК $(dT)_{20}$ [99], спектр действия для образования CPD (на основе данных иммунотот-блот-анализа [22]), УФ-спектр солнечного излучения Земли [21] и спектры эффективности, полученные как произведение спектра Солнца и спектра поглощения или спектра действия [49].

Ранее нами в кинетике флуоресценции комплексов красителей с ДНК были обнаружены компоненты с временем затухания ~ 10 пс, относительный вклад которых увеличивается с увеличением соотношения краситель/ДНК. Тушение красителей с увеличением r наблюдается также и на наносекундной временной шкале. Данные факты объяснены наличием сайтов тушения в ДНК и миграцией энергии возбуждения [88, 98]. Наблюдаемое тушение для части связанных

красителей объяснялось фотопереносом электрона с красителя на ДНК, что показано методом флэш-фотолиза. Это указывает на наличие стэкинг-конформаций в ДНК с низколежащими электронными орбиталями и, как следствие, большим восстановительным потенциалом по сравнению с мономерами и основной формой стэкинга.

Повреждения ДНК, вызванные УФ [18, 100-107] и ионизирующим излучением [19], распределены не случайным образом, и перенос энергии на большие расстояния обсуждался как возможное объяснение наблюдаемых эффектов. [12, 19] Экситонные состояния в ДНК могут усиливать перенос энергии аналогично природным фотосистемам. Прямых экспериментальных наблюдений делокализации возбуждения на больших участках в ДНК до сих пор не было получено, в отличие от антенн в фотосинтетических системах, для которых это было сделано ранее с помощью методов нелинейного поглощения и временной спектроскопии [86, 87, 110, 111]. Технические трудности в глубоком УФ-диапазоне и неоднородность изучаемых систем затрудняют исследование динамики экситонов в ДНК. В качестве альтернативного подхода эксперименты по передаче энергии с использованием оснований в качестве доноров и молекул, связанных с ДНК в качестве акцепторов, могут быть использованы для непосредственного измерения расстояния и эффективности миграции энергии возбуждения в ДНК. Изучались различные комплексы краситель-ДНК при комнатной температуре [12, 112-114]. В качестве акцепторов использовались также модифицированные основания, обладающие способностью к люминесценции [12, 115, 116]. Эксперименты показывали миграцию энергии только на расстояния в несколько оснований. Высокая эффективность переноса наблюдалась в случае 10-мера аденина с аминопурином в качестве акцептора (около 50%) [12]. Очевидно, что дальние когерентные эффекты не играли основной роли в относительно низкоэффективном захвате энергии акцепторами, используемыми в этих системах. Единственным надежным экспериментально обоснованным результатом, демонстрирующим перенос энергии с участием большого количества (порядка 100) азотистых оснований полиадениловой

кислоты, был получен при 77К [113]. Однако, механизмом переноса являлся прямой ферстеровский перенос с оснований, окружающих краситель в компактной форме полинуклеотида [114].

Гвин с соавт. [117] показали, что кластеры серебра способны выступать в качестве акцепторов электронного возбуждения в комплексах ДНК-кластер. На основе анализа спектров возбуждения флуоресценции кластеров было показано, что энергия возбуждения передавалась от ДНК к кластерам. Вывод был сделан на основе того, что все изученные в работе кластеры обнаруживали полосу возбуждения практически совпадающую с максимумом поглощения ДНК (рис. 1.1.14). Данные показывали, что энергия возбуждения переносилась на кластер с порядка 10 оснований. Однако гетерогенность растворов и неопределенность вклада кластеров в спектры возбуждения затрудняют корректную оценку дальности передачи энергии. А из-за отсутствия структуры флуоресцентных комплексов механизм переноса не известен. Тем не менее, комплексы ДНК с кластерами серебра представляются весьма перспективными для изучения процессов миграции энергии и заряда в наноструктурах на основе ДНК.

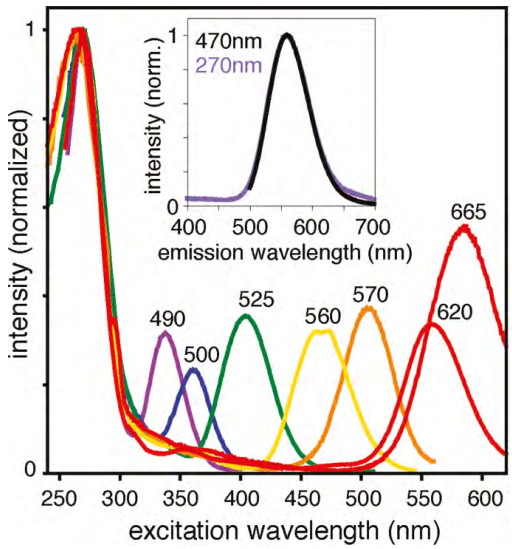


Рис.1.1.14. Спектры возбуждения комплексов Ag-DNA, изученных в [117].

1.2. Структура и фотофизические особенности комплексов ДНК с кластерами серебра.

Субнанометрические металлические кластеры являются предметом повышенного интереса в последнее десятилетие [44, 118, 119]. Обладая ярким излучением от видимого до ближнего инфракрасного диапазона, они считаются новыми перспективными флуорофорами для различных применений в электронных и фотонных устройствах, химических сенсорах, биосенсорах, фотоэлектрических элементах и т. д. Кластеры по своей энергетической структуре занимают промежуточное положение между атомами и наночастицами (рис. 1.2.1). Кластеры состоят из нескольких атомов (от двух атомов до нескольких десятков). Энергетический зазор больше величины кТ, и это позволяет кластерам люминесцировать.

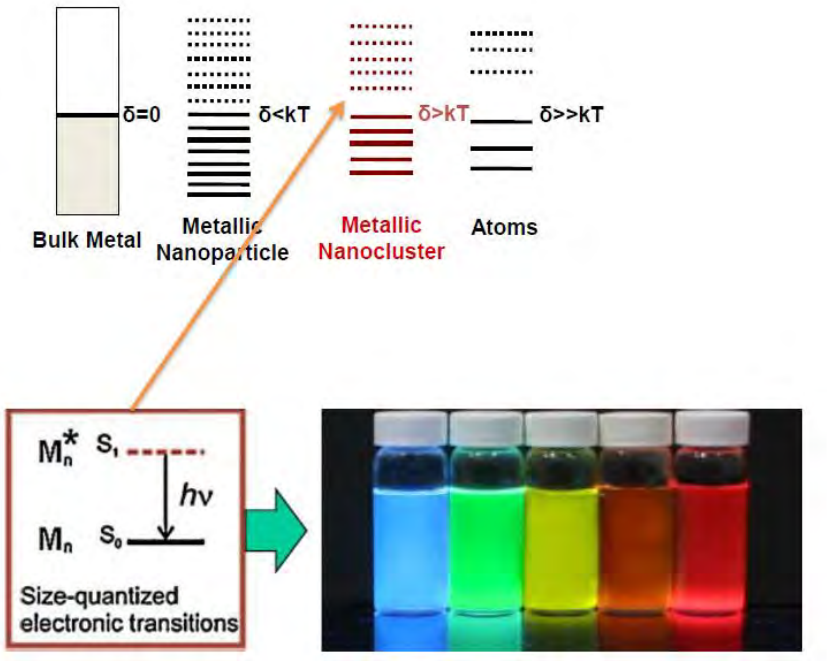


Рис. 1.2.1. Энергетическая структура металлов, металлических наночастиц, нанокластеров и атомов. Нанокластеры имеют энергетическую щель по величине превышающей тепловую энергию (kT), что является причиной их люминесценции в широком спектральном диапазоне.

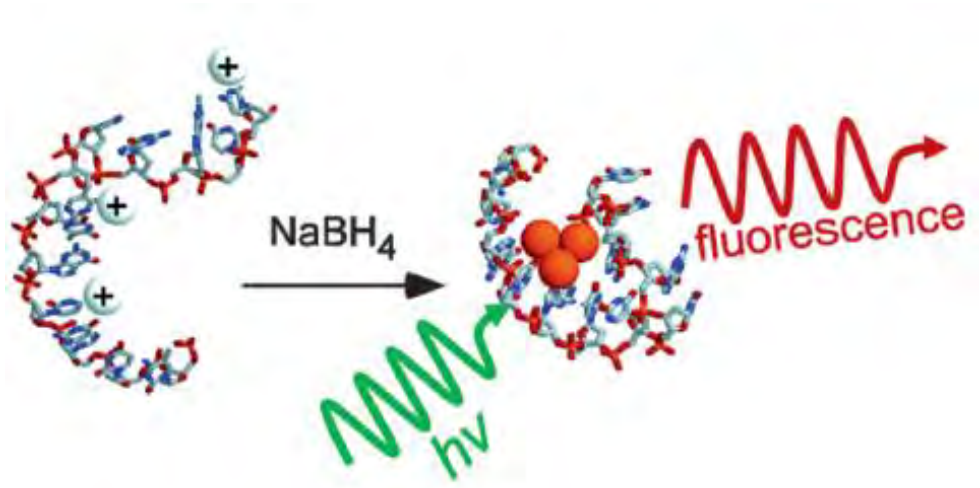


Рис. 1.2.2. Схема синтеза флуоресцирующих кластеров серебра на ДНК [121].

Различные синтетические “bottom-up” и “top-down” стратегии разработаны для синтеза нанокластеров. Большинство методов синтеза флуоресцентных металлических кластеров проводят в растворах в присутствии стабилизирующих агентов (как правило, полимерной матрицы), которые предотвращают агрегацию кластеров [120].

Кластеры серебра на ДНК (Ag-ДНК) можно синтезировать довольно просто путем восстановления борогидридом растворов комплексов ионов серебра с цепочками ДНК, которые имеют определенные последовательности, выбранные эмпирически для получения флуоресцирующих комплексов кластеров серебра с ДНК. Сначала к раствору олигонуклеотидов добавляется нитрат серебра ($AgNO_3$), ионы образуют комплексы с основаниями, и затем к раствору добавляется восстановитель, обычно борогидрид ($NaBH_4$). Спустя некоторое время, на матрице формируется кластер из восстановленных ионов серебра. Общая схема синтеза люминесцирующих кластеров на полимерной (в частности на ДНК) матрице показана на рис. 1.2.2 [121].

Значительная вариация в свойствах кластера при небольших изменениях ДНК последовательности является отличительной особенностью кластеров, синтезированных на матрицах ДНК. В табл. 1.2.1 [122] представлены данные по ряду кластеров серебра на ДНК, флуоресцирующих в широкой области спектра от синей до ИК.

Таблица 1.2.1. Параметры флуоресцирующих кластеров серебра на ДНК [122].

DNA sequences (from 5′ to 3′)	The number of bases	λ_{ex}/ λ_{em} (nm)	The number of Ag atoms in the DNA–Ag NCs	Lifetime (τ, ns)	ε (10^5 $M^{-1}cm^{-1}$)	Quantum yield (%)
AGGTCGCCGCCC	12	580/642	1–4			
dC_{12}	12	580/665	2–7			
ssC_{12}	12	≈ 650/≈700	2–3	2.6	3.2	17
CCCATATTCCCC	12	≈590/660		3.0±0.02 τ_{OPE} 3.1±0.02 τ_{TPE}		18
CCCTATAACCCC	12	≈605/680		3.0±0.02 τ_{OPE} 3.1±0.02 τ_{TPE}		37
CCCTAACTCCCC	12	≈630/710		3.5±0.02 τ_{OPE} 3.4±0.02 τ_{TPE}		31
CCCTTTAACCCC	12	≈350/485	<6			
CCCTCTTAACCC	12	≈420/520	<6			16±3
CCCTTAATCCCC	12	≈470/572	<6		2.0±0.4	38±2
CCTCCTTCCTCC	12	≈530/620	<6		1.2±0.3	32±4
CCCTAACTCCCC	12	≈650/705	<6		3.5±0.7	34±5
CCCACCCACCCTCCCA	16	750/810	10	1.8	1.8±0.5	30±2
C_{12}	12	467/523		3.6±0.1	1.2±0.3	27±2
$AATTC_{12}AATT$	20	480/562		4.3±0.1	2.0±0.4	38±3
$CGAAC_{12}CGAA$	20	543/590		2.0±0.1	3.5±0.7	36±3
CGCGCCCCCCCCCCCCCGCG	20	560/615		2.5±0.1	9.5±1.9	42±3
$ATATC_8ATAT$	16	570/635		2.3±0.1	2.8±0.6	26±3
$GGGGC_8GGGG$	16	600/670		2.7±0.1	3.2±0.7	43±3
$CGAACGCGC_{12}CGAACGCG$	28	560/618		3.5±0.1	2.5±0.5	16±2
ATCCGTCnACGGATA (n=3-12)	16-25					
$TATCCGTC_5ATAGGCA$	19	572.2/647.6				
$TGCCTATG_5ACGGATA$	19	509.2/573.6				
$TATCCGTC_5ACGGATA$	19	581.7/646.3				
$TATCCGTG_5ACGGATA$	19	544.6/614.6				
$TATCCGTA_5ACGGATA$	19					
$TATCCGTT_5ACGGATA$	19					
TGACTAAAAACCCTTAATCCCC AGTCACCCCAACCTGCCCTACCA CGGACT	29	530/600		2.9, 0.8		10±1
GGCAGGTTGGGGTGACTAAAAA CCCTTAATCCCC	34	595/650		3.5, 1.3		64±1

Как видно из представленных данных, многие кластеры характеризуются относительно высоким квантовым выходом флуоресценции с временем жизни порядка нескольких наносекунд и чрезвычайно высокими коэффициентами поглощения в видимой области. Такие ДНК-стабилизированные кластеры, впервые представленные в работе [121], в настоящее время исследуются с целью применения в различных приложениях, таких как биоимиджинг [123], схемы молекулярной логики [124, 125], детектирование мутаций [126-128], микроРНК [129] ДНК [130]. Подробный обзор можно найти в [131]. Принцип действия сенсоров основывается на изменениях цвета и интенсивности флуоресценции к окружению [129, 130].

Хотя большой прогресс был достигнут в синтезе флуоресцентных кластеров, демонстрирующих отличную яркость и фотостабильность, об их структуре мало что известно. В основном это связано с неоднородностью синтезированных кластеров. Как правило, спектры возбуждения флуоресценции кластеров, сильно отличаются от соответствующих спектров поглощения [117, 132], что свидетельствует о том, что химический выход кластеров, как правило, очень низок по сравнению с основной долей неизлучающих («темновых») кластеров и наночастиц. Наличие достаточного количества нелюминесцирующих металлических структур в растворе затрудняет исследование структуры люминесцентных кластеров. Любые структурные данные, полученные для таких сильно гетерогенных растворов, фактически не имеют отношения к люминесцентным кластерам. Хроматографическая или электрофоретическая очистка кластеров [132, 133] выглядит многообещающе для выявления строения флуоресцентных комплексов. Тем не менее, наблюдаемый заряд и количество атомов металла, даже для очищенных образцов, не обязательно относятся к металлическому ядру кластера, ответственного за люминесценцию металл-лигандного комплекса. Во многом это связано с полимерной матрицей, которая может содержать ионы металла, а также небольшие темновые кластеры с низким сечением поглощения которые не участвуют в процессах поглощения и эмиссии комплекса. В этом отношении спектры возбуждения флуоресценции, записанные

в широком спектральном диапазоне, обеспечивают уникальную селективность излучающих комплексов. В сочетании с QM/MM расчетами, они кажутся однозначным инструментом для идентификации структуры флуоресцентных центров кластер-лигандных комплексов. Однако, высоко уровеневое *ab initio* QM моделирование комплексов полимеров с металлическими кластерами, требующее много вычислительных ресурсов, остается сложной задачей. Существует ограниченное количество работ по расчетам спектров поглощения комплексов кластер-лиганд [134-137]. Однако рассчитанные спектры далеки от экспериментальных спектров возбуждения флуоресценции комплексов. Что касается свободных кластеров, то расчет их оптимизированных структур и их спектральные свойства широко представлены в литературе [134-144]. Заслуживают внимание, в частности работы, где расчетные спектры возбуждения обнаруживают хорошее согласие с экспериментальными данными. На рис. 1.2.3 представлены результаты расчетов наряду с экспериментальными спектрами [138]. Однако, изолированные свободные кластеры, как правило, плохо люминесцируют. На основании множества литературных данных можно сделать вывод о том, что люминесцентные способности присущи кластерам малых размеров, в частности для серебряных кластеров, преимущественно состоящих из трех атомов [145-148].

Что касается ДНК-стабилизированных кластеров, было отмечено [149], что общая форма возбуждения спектров люминесценции кластеров Ag предполагает вытянутую структуру флуоресцентных кластеров, в которых наблюдается один ярко выраженный интенсивный низко-энергетический переход вплоть до УФ-части спектра (рис. 1.2.4). На основе анализа масс-спектров (МС) [149] и моделирования методами молекулярной динамики (МД) [150], была предложена стержнеобразная модель структуры кластеров (рис. 1.2.5, 1.2.6). Тем не менее, МД структуры и их спектральные свойства не были проверены QM расчетами. Детальная структура флуоресцентных комплексов Ag и других металлических кластеров с полимерами по-прежнему остается сложной задачей в случае Ag-ДНК и многих других кластеров металлов.

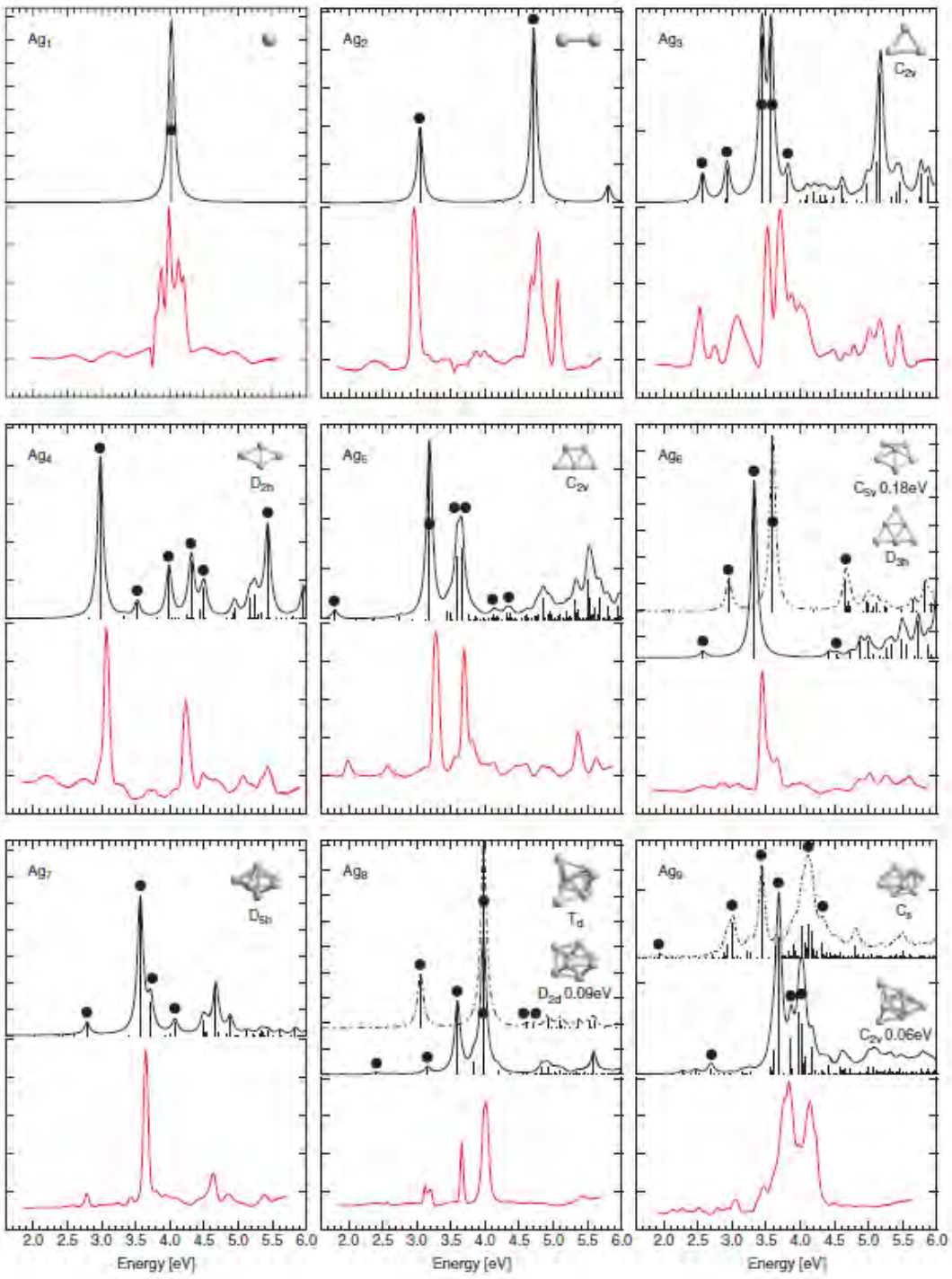


Рис. 1.2.3. Сравнение экспериментальных и расчетных спектров поглощения кластеров серебра. Экспериментальное поглощение для Ag_n (n = 1-9) - нижняя кривая. [138].

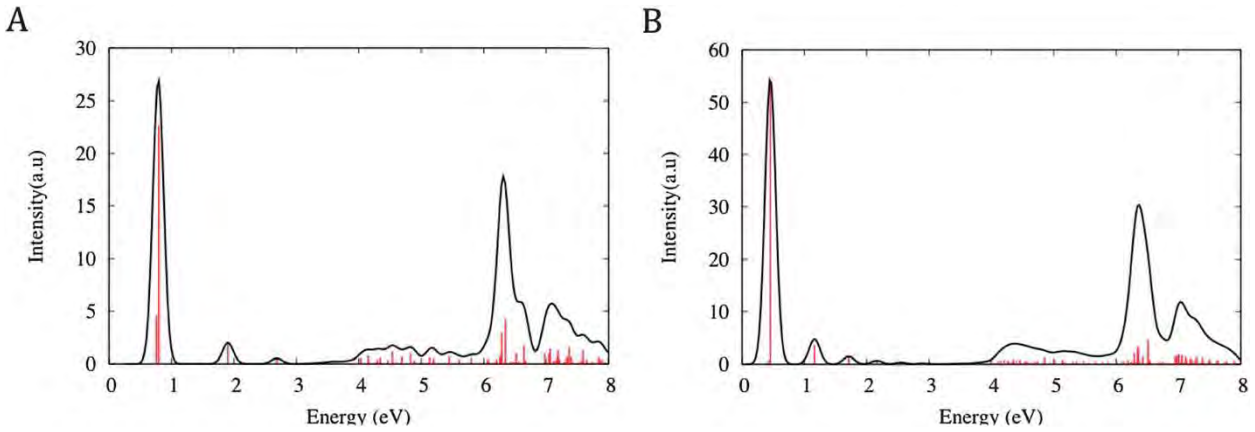


Рис. 1.2.4. Спектры возбуждения нанопроволоки (A) Ag_{20} и (B) Ag_{40} [142].

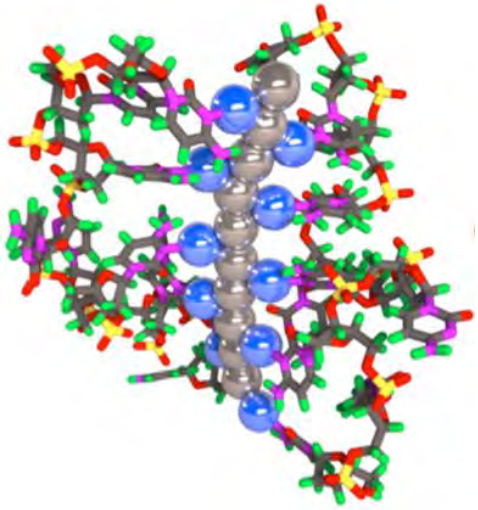


Рис. 1.2.5. Эмпирическая структура кластеров, предложенная в [149]. Голубым цветом выделены ионы, серым – нейтральные атомы серебра. Кластер в данной модели представляется как нейтральная цепочка атомов, стабилизированных двумя нитями ДНК с ионами серебра.

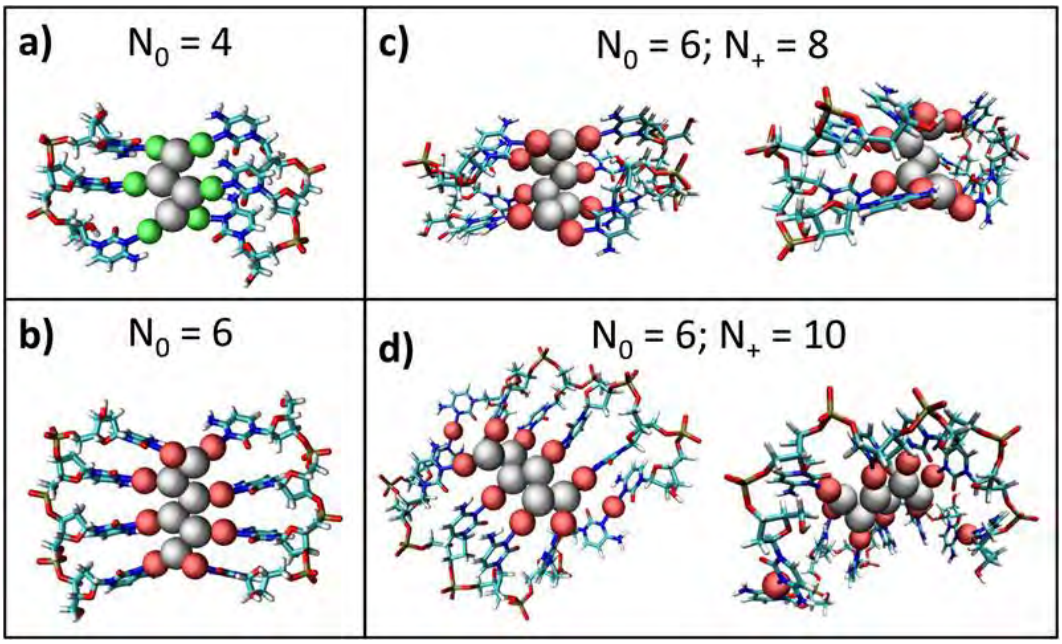


Рис. 1.2.6. Модели кластеров, предлагаемые на основе МД симуляции [150]. Цветом выделены ионы серебра. Указаны числа нейтральных атомов и катионов серебра, полученные на основе масс-спектрометрических данных.

Результаты работ [151, 152] показывают, что двойная спираль ДНК существенно уменьшает выход люминесцирующих кластеров. Напротив, наличие в структурах ДНК шпилек и неспаренных оснований (mismatches) благоприятствует их образованию.

На рис. 1.2.7. показаны различные структуры олигомеров, демонстрирующие различную способность к образованию флуоресцирующих кластеров: кластеры на полностью комплементарной двойной спирали, шпилечных структурах с A-петлей и T-петлей не флуоресцируют. На рис. 1.2.8 показаны структуры полностью комплементарного дуплекса и дуплекса, содержащего C-T некомплементарную пару. В случае отсутствия некомплементарных пар флуоресцирующие кластеры не образуются.

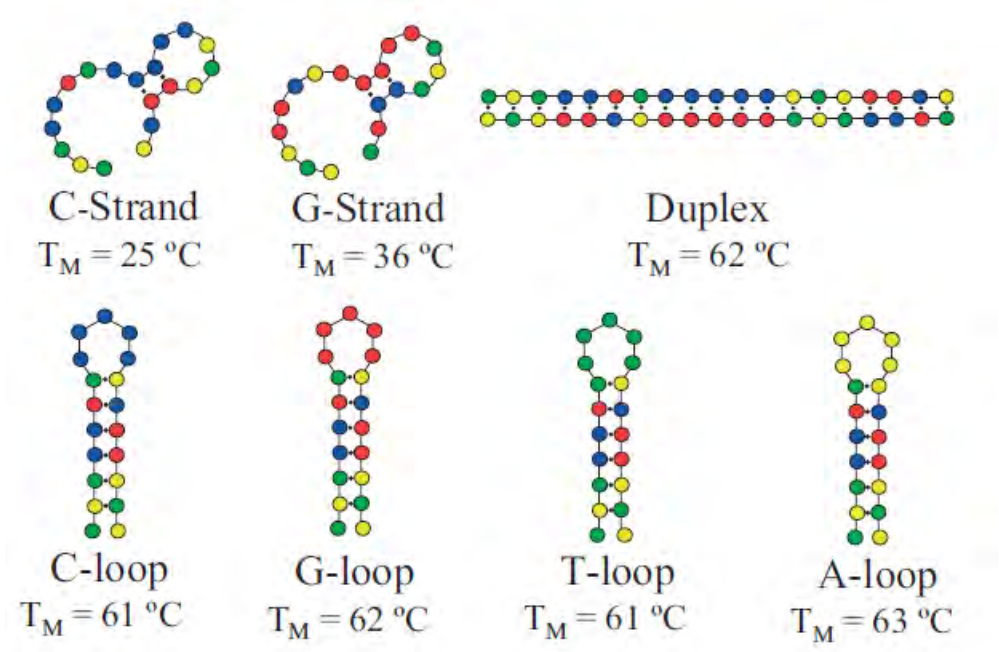


Рис. 1.2.7. Структуры олигомеров, демонстрирующие различную способность к образованию флуоресцирующих кластеров. Синий - цитозин (C), зеленый - тимин (T), красный - гуанин (G) и желтый - аденин (A). Указаны температуры плавления образованных вторичных структур ДНК (T_M) [151].

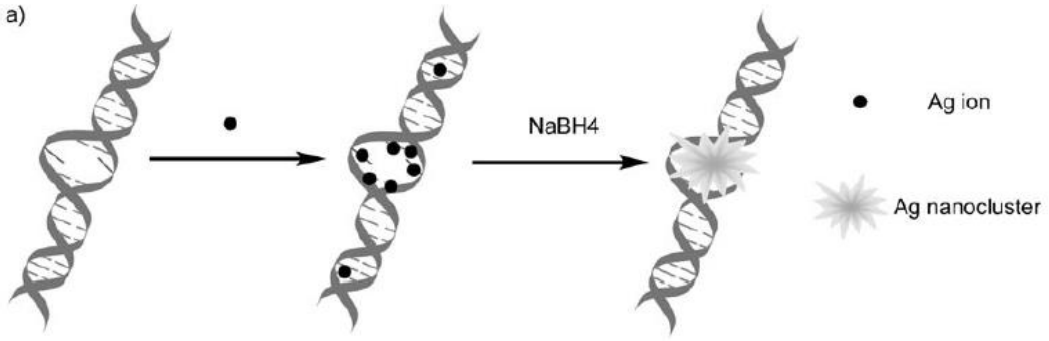


Рис. 1.2.8. Схематическое изображение сайт-специфического ДНК-программированного роста флуоресцентных нанокластеров Ag. [152].

Как указывалось выше, на первой стадии синтеза кластеров образуется комплекс ДНК с ионами серебра. Катионы серебра, однако, могут существенно

менять первоначальную (нативную) структуру ДНК. Возможность образования неканонических пар C-Ag+-C, G-Ag+-G (рис. 1.2.9), а также разрушение связей канонических пар оснований, может приводить как к образованию двуспиральных участков, так и к их разрушению [153-156].

В недавних работах группы Диксона с соавт. впервые были представлены детальные структуры кластеров на ДНК: структура темного нелюминесцирующего кластера, полученная на основе данных фотоэлектронной спектроскопии [157], а также кристаллическая структура люминесцирующего кластера (рис. 1.2.10) [158].

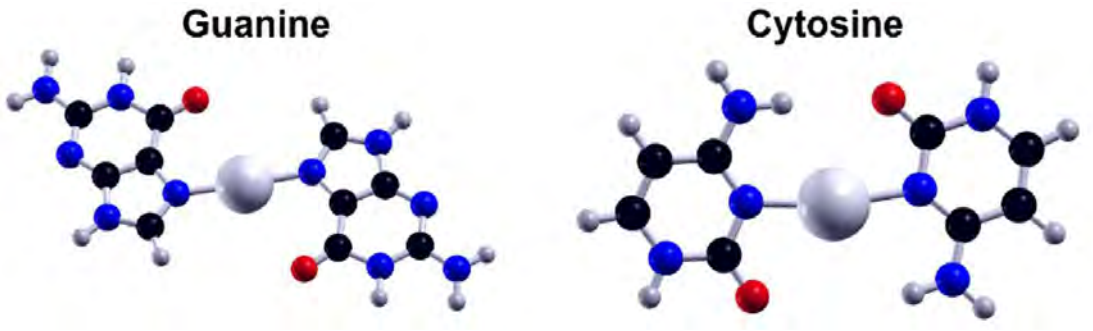


Рис. 1.2.9. Рассчитанная геометрия основного состояния G-Ag^{+}-G C-Ag^{+}-C пар оснований, стабилизированных ионами серебра [156].

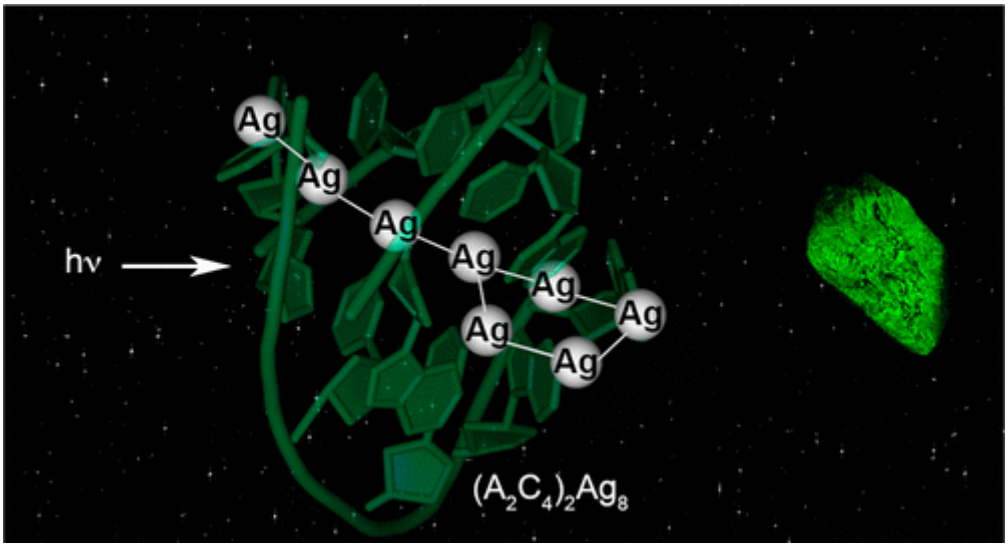


Рис. 1.2.10. Кристаллическая структура люминесцирующего кластера серебра на ДНК [158].

В целом, стоит отметить, что общепринятого ясного представления о структурах комплексов флуоресцирующих кластеров серебра с ДНК и о влиянии ДНК на их спектральные свойства на данный момент нет. Эта задача решалась, в частности, в данной диссертационной работе.

Интересной особенностью НК является относительно большой Стоксов сдвиг, разница между максимумами поглощения и излучения. Например, у кластера Ag-ДНК, излучающего в ближнем ИК-диапазоне, сдвиг 5600 $см^{-1}$ [159]. Большой Стоксов сдвиг является типичным проявлением существенной релаксации (структурной и/или растворителя) в возбужденном состоянии. Как быстро происходит эта релаксация? Динамический Стоксов сдвиг кластеров Ag-ДНК, наблюдаемый в экспериментах с наносекундным временным разрешением [159-163], не превышал 200 $см^{-1}$ в водном растворе, что означает, что основная релаксация происходит в пикосекундном и/или фемтосекундном масштабе времени. Выяснение ранней динамики эмиссии после фотовозбуждения в кластерах необходимо для развития этих систем для приложений, в которых требуется уменьшение безызлучательного распада для увеличения квантового выхода флуоресценции. Однако динамика эмиссии кластеров Ag в фемтосекундном масштабе времени практически не изучалась. Первые эксперименты с временным разрешением на фемтосекундной шкале времени для кластеров Ag-ДНК были выполнены Диксоном и др. [164]. На основании измерений переходного поглощения они предложили энергетическую диаграмму с четырьмя состояниями для кластера, излучающего в красном спектральном диапазоне. По их данным люминесцентное состояние кластера формируется за 350 фс. Тирхаг с соавт. [165] наблюдали сверхбыструю ~ 100 фс релаксацию возбужденного состояния ИК-излучающего кластера Ag-ДНК со стоксовым сдвигом 1000 $см^{-1}$. В целом, стоит отметить, что динамика возбужденных состояний кластеров мало изучена. В частности, образованию темновых состояний было уделено мало внимания. Тем временем темновые состояния в нанокластерах Ag, стабилизированных ДНК предлагается использовать в оптически модулированной микроскопии, которая значительно повышает

чувствительность обнаружения благодаря фотоиндуцированной релаксации темнового состояния (рис. 1.2.11) [166].

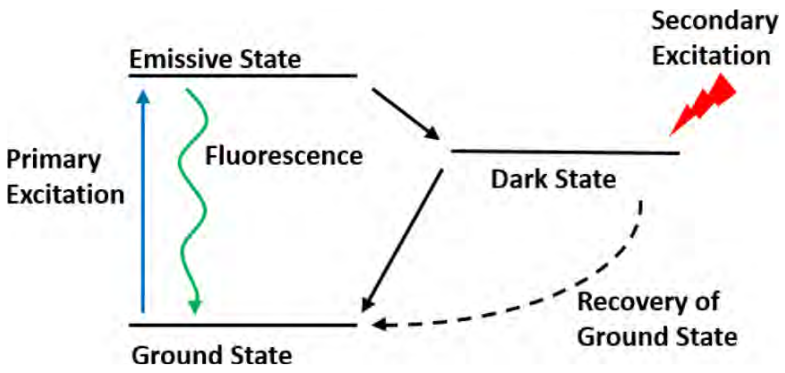


Рис. 1.2.11. Диаграмма Яблонского, отображающая основное, эмиссионное и темновое состояния кластеров. Возбуждение на 805 нм (красная стрелка) деактивирует темновое состояние быстрее, чем его естественная скорость распада, чтобы быстрее восстановить популяцию основного состояния и увеличить общую флуоресценцию [166].

Временная спектроскопия накачка-зонд обычно используется для обнаружения переходных состояний молекул. Однако неоднородные образцы, низкие концентрации, множественные вклады от поглощения возбужденных состояний, вынужденного излучения и процессов релаксации могут помешать интерпретации данных. Спектроскопия с насыщением флуоресценции может служить альтернативным мощным инструментом для изучения сложных многокомпонентных смесей органических соединений. [167] В данной работе флуоресцентная спектроскопия с использованием традиционных методов исследования используется для изучения динамики возбужденных кластеров и определения фотофизических констант первичных фотопроцессов в комплексах кластеров с ДНК.

ГЛАВА 2. ОСНОВНЫЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ И ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

2.1. Образцы.

ДНК. В экспериментах по изучению собственной люминесценции компонентов ДНК использовались ВЭЖХ очищенные олигонуклеотиды фирмы Syntol (Москва, Россия), тимусная ДНК (СТ ДНК), дезоксицитидин-5'-монофосфат (dCp) фирмы Sigma-Aldrich. Растворы приготавливались, используя деионизованную воду системы очистки milli-Q. В типичной пробоподготовке олигонуклеотиды и мономеры ДНК растворяли в воде (pH 6), смешивали с подходящим буфером, боратом (pH 9) или цитратом (pH 3) для поддержания требуемого pH. Для всех образцов оптическая плотность на 266 нм была равна 1 (кварцевая кювета с длиной пути 4 мм) и 1,5 (вращающаяся кварцевая ячейка с длиной пути 0,4 мм) при измерениях стационарной флуоресценции и кинетических измерениях, соответственно.

Синтез кластеров серебра на олигонуклеотидах и СТ ДНК. Обычно олигонуклеотиды и водные растворы нитрата серебра ($AgNO_3$) смешивали и выдерживали в течение 15 минут при комнатной температуре. Затем добавляли водный раствор боргидрида ($NaBH_4$) с последующим интенсивным перемешиванием. Оптимальные конечные концентрации приведены в таблице 2.1.1.

Ионно-парная жидкостная хроматография ВЭЖХ для зеленого кластера на 15-мере ДНК и кластера с красным излучением на 12-мере ДНК выполнялась на колонке C18 (Supelco Discovery 250 x 4,6 мм, 5 мкм; градиент B в A 1 -50% через 30 мин; A = 70 мМ водный буфер с ацетатом триэтиламмония (pH 7,5); B ~ 70 мМ раствор ацетата триэтиламмония в метаноле). Соответствующие хроматограммы показаны на рис. 2.1.1.

Таблица 2.1.1. Матрицы ДНК и оптимальные параметра синтеза люминесцентных кластеров на них.

Матрица /цвет люминесценции кластера	$AgNO_3$, мкМ	$NaBH_4$, мкМ	ДНК, мкМ	Т, C^0	Время синтеза	Буфер, pH
CT ДНК (денатурированная на водяной бане)	24	10	40 μg/mL	21	1 неделя	Вода, 5 mM $NaNO_3$ pH 6
5'-CCTCCTTCCTCC-3'/красный	120	30	20	20	1 день	Цитратный буфер, pH5
5'-CCTCCTTCCTCC-3'/зеленый	120	30	20	20	1 неделя	Вода, pH 6
5'-CCTCCTTCCTCC-3'/ Фиолетовый	120	30	20	20	2 месяца	Вода, pH 6
5'-CGCCCCCCTCGGCGT-3'/ Зеленый	150	75	25	20	4-8 часов	Ам. Ацетат pH 7
5'-CGCCCCCCTCGGCGT-3'/ Синий	150	75	25	37	3 часа	Вода, pH 6

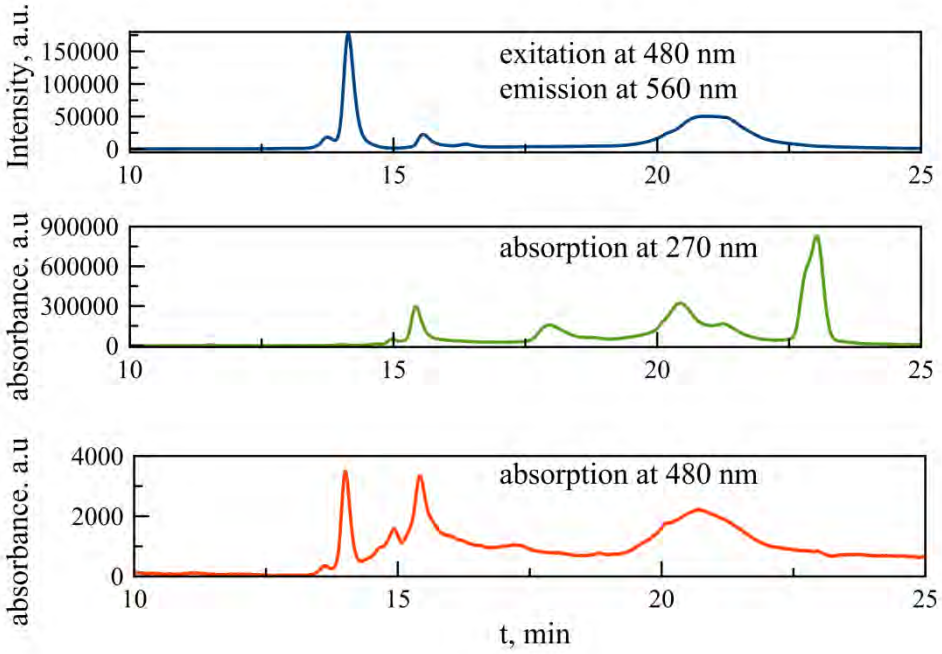


Рис. 2.1.1. Хроматограммы ВЭЖХ, полученные с детектором люминесценции (вверху) и поглощения на 270 нм (в центре) и на 480 нм (внизу) для кластеров на 15-мерном олигонуклеотиде. Флуоресцентный комплекс выходит через 14,2 минуты [56].

2.2. Экспериментальные методы.

Стационарная люминесцентная, абсорбционная, КД спектроскопия в УФ и видимой областях спектра. Спектры флуоресценции, возбуждения и поляризационные спектры образцов записывались на спектрофлуориметре Fluorolog 3 (Horiba Jobin-Yvon). Люминисценция растворов в 4 мм кварцевой кювете регистрировалась под прямым углом к возбуждающему пучку. Рассеянный свет отрезался с помощью соответствующих длинноволновых светофильтров. Как правило, использовались спектральные щели от 2 до 5 нм, спектры записывались с шагом 1 нм со временем накопления от 0,1 до 1 с на точку и усреднялись 1-4 раза. Все параметры были оптимизированы в зависимости от интенсивности флуоресценции образцов для получения

приемлемого отношения сигнал / шум. Спектры флуоресценции излучения были скорректированы с учетом чувствительности прибора, предоставленной производителями. Коррекция была проверена, как описано ниже. Следует также учитывать, что различие в поляризации излучения может влиять на наблюдаемые интенсивности спектров возбуждения [168]. Чтобы исключить возможные ошибки, мы использовали вертикально ориентированный поляризатор в канале возбуждения, а другой поляризатор был помещен под «магическим» углом в канале излучения.

Коррекция спектров возбуждения флуоресценции включает 3 основных фактора, которые были учтены при регистрации и обработке спектров.

1) Как правило, часть света со светоделителя поступает на фотодиод в опорном канале, на выходе которого формируется опорный сигнал R. Сигнал с основного ФЭУ (S) делится на опорный сигнал. Отношение S/R дополнительно корректируется на спектральную чувствительность светоделителя и фотодиода. Коррекция, предоставленная производителем, была проверена путем сравнения спектра возбуждения разбавленного этанольного раствора родамина 6G (оптическая плотность (D) на 530 нм <0,01) с его спектром поглощения (рис. 2.2.1). Спектр поглощения измеряли с помощью двухлучевого сканирующего спектрофотометра Lambda 1050 (PerkinElmer) в 4-мм кварцевой кювете (Quartz Suprasil, Hellma Analytics). Как видно, спектр поглощения хорошо совпадает со спектром возбуждения в диапазоне от 250 до 600 нм. Таким образом, коррекция прибора, предоставленная производителем, использовалась при записи спектров возбуждения без дополнительных корректировок.

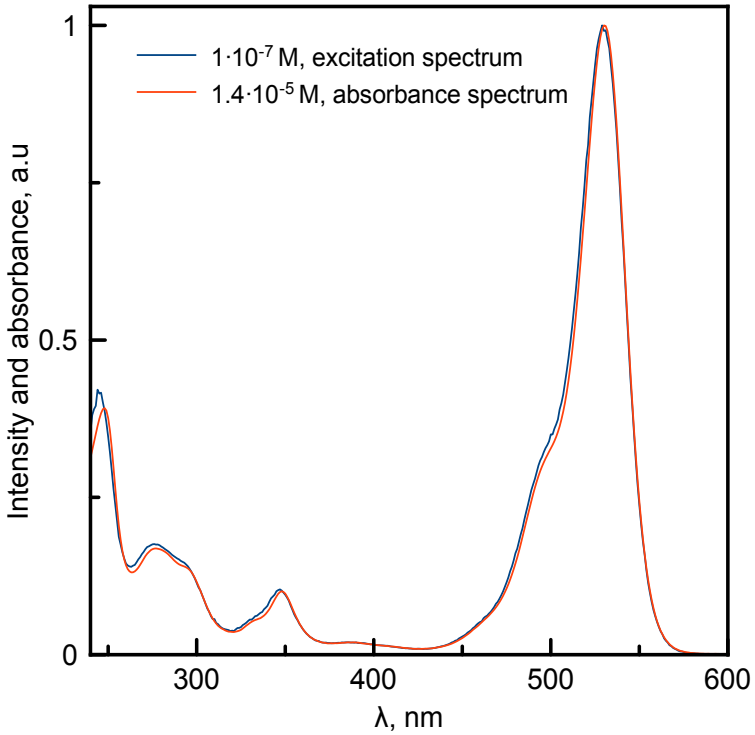


Рис. 2.2.1**.** Нормированный спектр возбуждения $1 \cdot 10^{-7}$ М родамина 6G (λem = 640 нм) и спектр поглощения $1.4 \cdot 10^{-5}$ М родамина 6G в растворе этанола [56].

2) Монохроматор и фотоумножитель чувствительны к поляризации падающего света. Анизотропия флуоресценции образцов может значительно различаться в УФ и видимом диапазоне, что приведет к искажению спектра возбуждения. Чтобы исключить поляризационные эффекты, два поляризатора в каналах возбуждения и излучения были установлены под «магическим» углом [168]. Поправка на поглощение поляризатора также была сделана с использованием спектра пропускания поляризатора, полученного как отношение спектров возбуждения родамина 6G с поляризатором в канале возбуждения и без него (рис. 2.2.2). В этом случае флуоресценция полностью деполяризована, и разница между спектрами обусловлена поглощением поляризатора в УФ-области. Поправочный коэффициент, полученный таким образом как отношение спектров, был дополнительно применен ко всем зарегистрированным спектрам возбуждения.

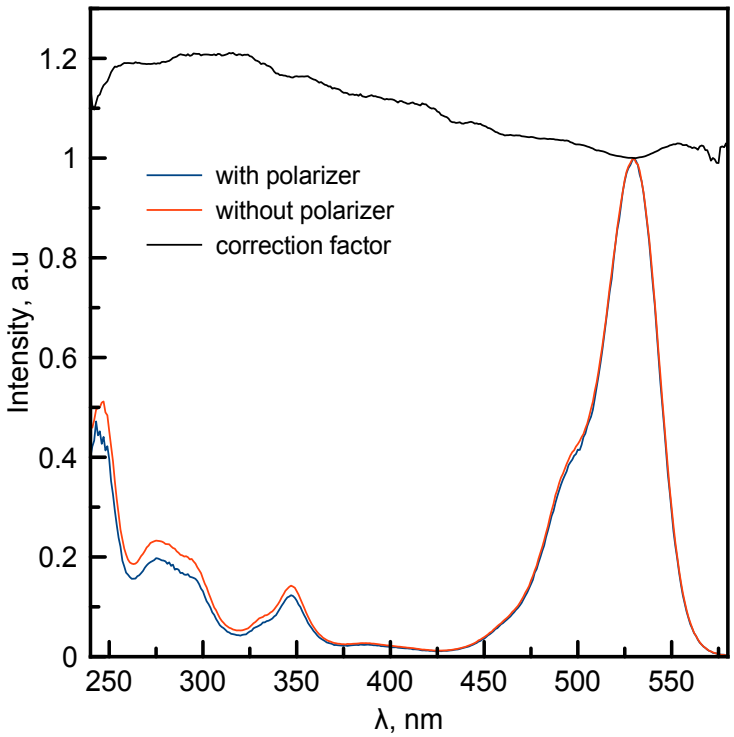


Рис. 2.2.2. Нормированные спектры возбуждения $1{,}4 \cdot 10^{-5}$ М родамина 6G (λ_{em} = 640 нм), записанные с поляризатором и без него в канале возбуждения, и рассчитанный поправочный коэффициент [56].

3) Оптическая плотность растворов обычно находилась в диапазоне 0,2-0,4 в 4 мм кювете. В этом случае следует учитывать эффект внутреннего фильтра. Спектр возбуждения раствора $1{,}4 \times 10^{-4}$ М родамина 6G, скорректированный по стандартной формуле (2.2.1) [169],

$$I_{corrected} = \frac{I_{measured} \cdot 2.303 \cdot D}{1-10^{-D}} \qquad (2.2.1),$$

показывает небольшое отклонение от спектра, полученного для разбавленного раствора (D <0,01), в то время как спектр, скорректированный с помощью (2.2.2), совпадает со спектром для разбавленного раствора (рис. 2.2.3).

$$I_{corrected} = \frac{I_{measured} \cdot 2.303 \cdot D \cdot 0.75}{1-10^{-D \cdot 0.75}} \qquad (2.2.2)$$

Этот факт указывает на то, что в нашем случае большая часть света собирается с первых 3/4 длины пути кюветы, что снижает эффективное поглощение. Таким образом, уравнение (2.2.2) было использовано при коррекции спектров возбуждения для эффекта внутреннего фильтра.

Степень поляризации флуоресценции вычислялась как $(I_0 - G \cdot I_{90})/(I_0 + G \cdot I_{90})$, где I_0, и I_{90} - интенсивности люминесценции с вертикальной и горизонтальной поляризацией, соответственно, при возбуждении в вертикально поляризованном свете, а G – приборный фактор, рассчитанный как I_0/I_{90} при возбуждении в горизонтально поляризованном свете.

Спектры КД записывались на спектрополяриметре Jasco J-815. Спектры поглощения и кривые плавления получали с помощью спектрофотометра Specord 210 Plus с держателем с ячейкой Пельтье и мешалкой.

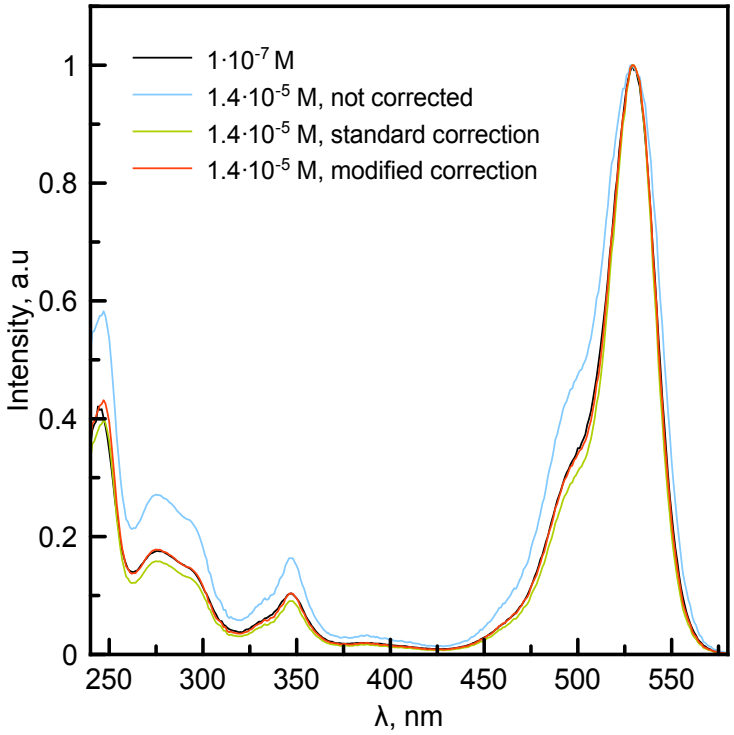


Рис. 2.2.3. Спектры возбуждения флуоресценции в растворе $1.4 \cdot 10^{-5}$ М родамина 6G: некорректированый, скорректированный по стандартной формуле (2.2.1) и модифицированной формуле (2.2.2); спектр возбуждения для 10^{-7} М раствора родамина 6G (λem = 640 нм) [56].

Масс-спектрометрия. Масс-спектрометрические измерения проводились на спектрометре Bruker Daltonik GMBH. Капиллярное напряжение было установлено 4,0 кВ. Температура источника была 180 ° С. Масс-спектры регистрировались в диапазоне 300-2900 *m/z* в отрицательном режиме ESI. Исходный раствор 800 мМ

1,1,1,3,3,3 гексафтор-2-пропанола доводили до pH 7 триэтиламином и затем разбавляли в два раза образцом для дальнейших измерений. Использовали концентрации ДНК от 30 до 200 мкМ. Измеренное зарядовое состояние *z* и масса иона *m* определялись из огибающей изотопного пика. Количество катионов серебра N определяется как N = (m-W-z) / (m_{Ag}-1), где W - молекулярная масса неионизированной цепи ДНК, m_{Ag} - атомная масса серебра.

Временная спектроскопия. Измерения кинетики флуоресценции на фемтосекундной шкале проводились с помощью флуоресцентного временного спектрометра, работающего в режиме ап-конверсии FOG 100-DX, с генераторами второй и третьей гармоник CDP 2015 (CDP, Москва, Россия, рис. 2.2.4). Возбуждение в полосе ДНК осуществлялось третьей гармоникой (266 нм) Ti-сапфирового лазера с синхронизацией мод (TISSA, CDP Corp., Москва, Россия), работающего на частоте 86 МГц. Выходной луч с мощностью 10 мВт диаметром 3 мм фокусировался линзой 100 мм. Временное сканирование было выполнено в временных интервалах 2-10 пс с шагом 7,8-78 фс и временем интегрирования 1-5 с, чтобы получить удовлетворительное отношение сигнал / шум. Растворы ($5\cdot10^{-4}$ М ДНК) помещали во вращающуюся кварцевую кювету толщиной 1 мм. Все измерения проводились при комнатной температуре. Фотовыцветание образцов не превышало 5% за одно сканирование. Аппаратная функция (IRF) определялась путем измерения сигнала рамановской линии в воде. Ширина на полувысоте (FWHM) IRF обычно составляла менее 350 фс. Нелинейная регрессия была выполнена с использованием экспоненциальных функций (до трех экспонент), свернутых с Гауссовой аппаратной функцией. Возбуждение в полосе поглощения кластеров осуществлялось второй гармоникой (400 нм) лазера Synergy 20. FWHM IRF обычно была меньше чем 200 фс. Кривые затухания люминесценции в наносекундном диапазоне были получены с использованием метода время-коррелированного счета фотонов (TCSPC) на спектрофлуориметре Fluorolog 3. В качестве источника возбуждения использовались лазерные диоды с длительностью импульсов порядка 1 нс.

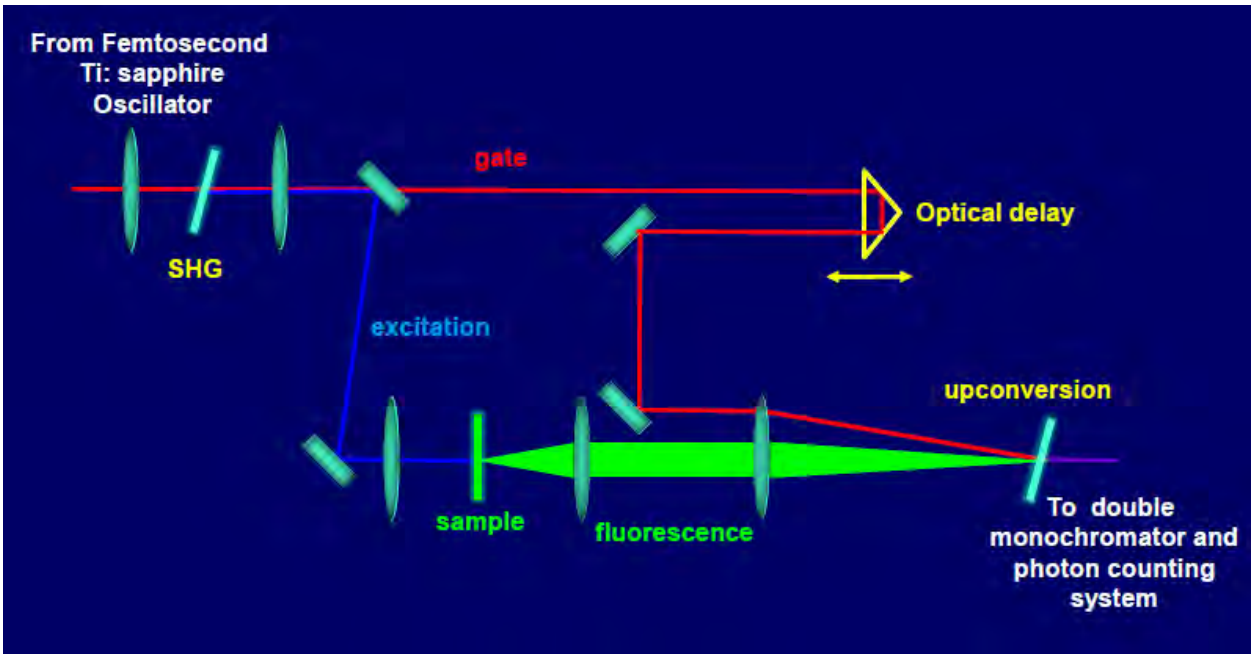


Рис. 2.2.4. Основные оптические элементы ап-конверсионного спектрометра FOG 100. С принципом работы установки можно ознакомиться в работе [168].

Флуоресцентная спектроскопия насыщения. Кривые насыщения флуоресценции получали, возбуждая образцы импульсами с частотой 10 Гц и энергией импульса до 100 мкДж, получаемыми путем усиления импульсов 800 нм фемтосекундного лазера (Synergy 20) цепочкой усилителей (Pulsar 10 мДж, Amplitude Technologies). Длина волны в пределах 480-540 нм перестраивалась с помощью оптического параметрического усилителя (OPA), который давал энергию выходного импульса около 100 мкДж при 530 нм. Импульс растягивался примерно до 1 пс, чтобы избежать стимулированного излучения образца. Выходной пучок был ограничен диаметром 2,5 мм с помощью диафрагмы. Для возбуждения в наносекундном диапазоне мы использовали твердотельный Nd:YAG-лазер с удвоенной частотой модуляции добротности («Quantel», 532 нм, импульс 10 нс, 10 Гц, 100 мДж). В обоих случаях люминесценция образца в кювете 1x0,4 см собиралась под прямым углом с помощью портативного спектрометра («Ocean Optics»). Отрезающий фильтр был использован для удаления рассеивающего света. Интенсивность возбуждения ослаблялась нейтральными фильтрами и измерялась на выходе пироэлектрическим

приемником («Gentec-EO») и. Растворы интенсивно перемешивали в ходе экспериментов, и фотовыцветание не превышало 20% в случае наносекундного импульса и 5% в случае возбуждения пикосекундным импульсом, что было определено по измерениям флуоресценции образцов до и после эксперимента. Для моделирования кривых в режиме возбуждения наносекундной длительности мы решали систему уравнений (см. Гл. 6) и численно интегрировали заселенность возбужденного состояния с шагом $2 \cdot 10^{-14}$ $с^{-1}$, используя формализм Рунга–Кутта, реализованный в пакете MatLab. Параметры варьировались с соответствующим шагом для наилучшего соответствия экспериментальным точкам с использованием критерия RMSD. В случае непрерывного (CW) возбуждения использовался лазер накачки (Finesse, Laser Quantum) с выходной мощностью 2 Вт на 532 нм. Луч был ограничен диафрагмой до 2 мм. Возбуждение осуществлялось короткими ~ 0,2 с одиночными импульсами, чтобы избежать фотодеградации образцов. Интегральную флуоресценцию измеряли с помощью фотодиода.

Измерения фотоэлектронных спектров (XPS). Тонкие пленки комплексов ДНК-серебро получали путем осаждения нескольких капель раствора на свежерасщепленную поверхность высокоориентированного графита (HOPG) с последующей сушкой аргоном или азотом. Обычно для каждого образца цикл осаждения / сушки повторяли 2-3 раза, чтобы получить пленки, достаточно толстые, чтобы исключить сигнал от подложки HOPG в спектрах фотоэмиссии (PE), но в то же время достаточно тонкие, чтобы предотвратить чрезмерную зарядку образцов. Расщепление и осаждение образца, а также его перенос в вакуумную камеру проводили в атмосфере аргона или азота, чтобы минимизировать поверхностное загрязнение. Измерения спектров ДНК, комплексов ДНК с катионами и нанокластерами серебра проводились на рентгеновском фотоэлектронном спектрометре ESCALAB 250Xi, оборудованном монохроматическим рентгеновским источником Al Kα. Чтобы проверить однородность образцов, измерения проводились в нескольких точках на поверхности каждого образца. Никаких значительных изменений в спектрах XPS

не наблюдалось при повторном сканировании, что указывает на то, что образцы ДНК были довольно стабильными под рентгеновским излучением. Стехиометрия полученных пленок контролировалась в соответствии с разработанным в литературе подходом количественных измерений рентгеновской фотоэлектронной спектроскопии, основанным на сравнении относительных интенсивностей сигналов электронов остовных уровней [170]. Спектры аппроксимировались с использованием гауссово-лоренцевых функций с одновременной аппроксимацией фона. Все энергии связи пиков фотоэмиссии приведены с точностью ± 0,1 эВ.

2.3. Теоретические методы.

Молекулярная динамика (МД) ДНК. МД моделирование одноцепочечного $(dT)_{18}$ олигомера проводилось в программном пакете Gromacs 4.5.5 [171] с использованием силового поля AMBER parmbsc0 [172]. Для модели ДНК в растворе использовали периодическую ячейку в форме куба с параметрами 14x14x14 нм, в качестве растворителя была использована модель воды TIP3P. Отрицательно заряженные фосфатные группы ДНК нейтрализовали соответствующим количеством Na^+ противоионов. Мы также добавили 30 молекул NaCl, что соответствует концентрации электролита 50 мМ. Удаленные электростатические взаимодействия рассчитывались согласно методу Эвальда (PME) [173]. МД расчет в NVT ансамбле проводили, используя баростат Парринелло-Рамана с шагом интегрирования 2 фс. Координаты записывали каждые 24000 шага интегрирования. Длины водородных связей ограничивали с помощью алгоритма LINCS [174]. Через 10 нс нагревания всей системы до 350 К и уравновешивания, проводилось МД моделирование в течение 30 нс при температуре 310 К.

Расчет спектров поглощения ДНК. Структуры гомодимеров азотистых оснований и тетрамер i-мотива получали из PDB структур ДНК мотивов, а также из данных МД расчета. Геометрии мономеров оптимизировались и вставлялись в

исходные PDB геометрии димеров. Оптимизация геометрии мономеров выполнялась с использованием метода теории возмущений Меллера–Плессе второго порядка (MP2) [175], а также с помощью базиса aug-cc-pVDZ [176], реализованных в программном пакете ORCA [177]. В наших расчетах мы использовали 9-метиладенин как мономер аденина, 1-метилцитозин как мономер цитозина и 1-метилтимин как тимин. В случае тетрамера i-мотива мы использовали цитозин в качестве мономера вместо 1-метилцитозина во время расчета спектров поглощения. Расчет спектров поглощения выполнялся с использованием различных высокоуровневых методов для «вакуума»: методом CIS с учетом дважды возбужденных конфигураций по теории возмущений 2-го порядка CIS(D) [178], методом связанных кластеров с учетом однократных и двукратных возбуждений CC2 [179], методом алгебраического диаграммного построения второго порядка ADC(2) [180] с использованием “resolution of the identity” (RI, разложение единицы, вычислительный прием, позволяющий существенно снизить вычислительные затраты) [181]. Электронные плотности рассчитывались в программном пакете ORCA. Анализ матрицы плотности для переходов на основании базисных атомных орбиталей выполнялся в пакете TheoDORE [182] с использованием следующих дескрипторов [183]: PR – коэффициент участия, отражающий делокализацию; CT – общее количество перенесенного заряда (в том числе зарядовый резонанс и направленные вклады переноса); CTnet - суммарное смещение заряда. Расчеты методом CIS(D) проводились в ORCA, CC2 и ADC(2) расчеты выполнялись в Turbomole [184]. В случае полу-протонированного цитозинового тетрамера использовалась континуальная модель учета растворителя COSMO.

QM/MM моделирование комплексов ДНК с серебром. Равновесная структура комплекса ДНК с Ag^+ была получена с помощью QM/MM (квантово-механическая/молекулярно-механическая) оптимизации геометрии ДНК дуплекса, содержашего ионы серебра, с учетом растворителя в программе CP2K [185]. Пары C-Ag^+-C брали в транс-конфигурации, поскольку именно она является более энергетически выгодной [154]. QM часть системы включала азотистые основания

и ионы серебра, в то время как ММ часть состояла из сахарофосфатного остова ДНК, а также ионов натрия как противоионов. В ММ части использовали силовое поле parmbsc0, периодические граничные условия, модель воды TIP3P. Релаксацию геометрии в QM части проводили, используя теорию функционала электронной плотности (DFT) с псевдопотенциалом плоских волн в обратном пространстве, а именно псевдопотенциалы Гёдекера-Тетера-Хюттера (GTH) [186] для электронов атомного остова, молекулярно-оптимизированный DZVP-MOLOPT-GTH [187] базисный набор для валентных электронов и GGA (обобщенное градиентное приближение) функционала PBE [188]. Совокупный заряд QM и ММ части был приравнен к нулю путем удаления лишних Na^+ ионов. В случае 12-мерной ДНК проводили МД всей системы в течение 2 пс, используя NPT ансамбль при 300 К с шагом интегрирования 2 фс и с наложением ограничений на водородные связи. На заключительном этапе проводили оптимизацию всей QM/MM системы, начиная с последнего шага МД. Аналогичные расчеты были выполнены с добавлением атомов серебра. Мы нашли, что метод оптимизации геометрии значительно влияет на вид спектров поглощения [54]. Поскольку электронные спектры чувствительны к геометрии комплексов, перед расчетом спектров проводили дополнительную оптимизацию для QM области Ag-ДНК системы с использованием гибридного DFT функционала PBE0 [189], базиса def2-SVP [190] и континуальной модели растворителя, реализованной в программе Firefly v.8.0.1 [191]. Для этого фиксировали координаты атомов углерода метильных групп 1-метилцитозина и 1-метилтимина, имитирующих углероды сахарофосфатного остова.

Расчет спектров поглощения серебряных кластеров. Мы сравнили различные ab initio и TDDFT методы расчета энергии возбуждения комплексов пиридинов с серебряными кластерами [54]. Спектры рассчитывались с использованием методов CIS, CIS(D), CC2, ADC(2), и нестационарную теорию функционала плотности (TDDFT) с использованием различных гибридных GGA и мета-гибридных GGA функционалов. Мы показали, что функционал M06-2X [192] демонстрирует высокую точность в сравнении ADC(2) ab initio методом. Поэтому,

наряду с ADC(2)/def2-SVP методом, при рассчетах спектров комплексов ДНК с кластерами применялся TDDFT, а именно M06-2X/def2-SVP метод [51, 52, 56]. Спектры рассчитывались в программе Turbomole. Анизотропия люминесценции для каждого перехода в спектре возбуждения рассчитывалась согласно формуле $r=(3\cos 2\alpha -1)/5$ [168], где α – это угол между S_0-S_1 и S_0-S_n дипольными моментами переходов. Полная анизотропия рассчитывалась путем суммирования всех электронных переходов, взвешенных согласно их относительному вкладу на данной длине волны. Для учета вращательного движения комплексов вводился эмпирический коэффициент масштабирования.

Расчет спектров возбуждения свободных серебряных кластеров. Оптимизацию геометрии основных и возбужденных состояний проводили в DFT, реализованном в программе GAMESS US [193]. Для атомов серебра использовали релятивистский остовный эффективный потенциал RECP для 28 остовных электронов [194]. Для остальных атомов применяли валентный дабл-зета поляризационный базис 6-31G* [195]. Для оптимизации геометрии основного состояния использовали rPBE [196] функционал. Оптимизацию геометрии свободных кластеров и комплексов кластеров с азотистыми основаниями производили без каких-либо ограничений в «вакууме». Для нитевидных свободных кластеров использовалась одномерная градиентная оптимизация. Спектры возбуждения рассчитывали методом TDDFT B3LYP/LANL2DZ/6-31G* [197].

ГЛАВА 3. НИЗКО-ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЕ ЭЛЕКТРОННО-ВОЗБУЖДЕННЫЕ СОСТОЯНИЯ В ДНК

Конформационная гетерогенность НК приводит к их спектральной гетерогенности, наблюдаемой в спектрах действия [22], флуоресценции [82] и ее возбуждения [65, 96]. Низко-энергетические электронные переходы, наблюдаемые в спектрах, а также сильная зависимость величины экситонного расщепления от межплоскостного расстояния азотистых оснований, предсказанная теоретическими оценками [60], указывают на возможность существования стэкинг-конформаций оснований с низко-лежащими ЭВС в области длинноволнового края полосы поглощения ДНК. Для понимания природы таких низко-лежащих ЭВС были проведены теоретические оценки энергий и выполнен анализ ЭВС оснований, находящихся в различных формах стэкинга [49]. Эти результаты описываются в данной главе диссертации.

3.1. Расчеты спектров электронного возбуждения мономеров ДНК и димеров в В-форме ДНК.

Для выбора оптимального метода расчета спектров димеров азотистых оснований, находящихся в различных конформациях в структурах НК, мы провели сравнительный анализ спектров оснований и димеров оснований в В-форме ДНК, используя различные методы расчета и базисные наборы. Анализировалось влияние базиса и метода на положение первого $\pi\pi^*$ перехода в мономере и его расщепление в димере. Структуры димеров были взяты из базы PDB. На рис. 3.1.1-3.1.3 показаны структуры димеров тимина, аденина и цитозина, взятые из рентгено-структурных данных для молекул ДНК, находящихся в В-форме. На рисунках обозначены также два структурных параметра, используемых в дальнейшем анализе: расстояние между серединами связей C6−C5 (d) и двугранный угол C5−C6−C6−C5 (η).

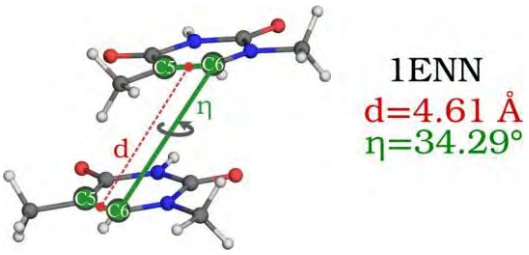


Рис. 3.1.1. Структура тиминового димера в B форме ДНК, PDB ID: 1ENN [198].

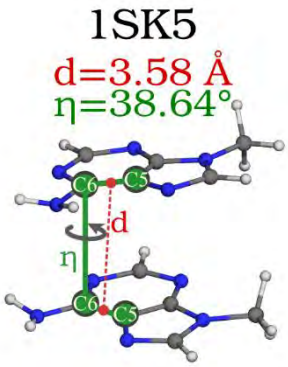


Рис. 3.1.2. Структура аденинового димера в B форме ДНК, PDB ID: 1SK5.

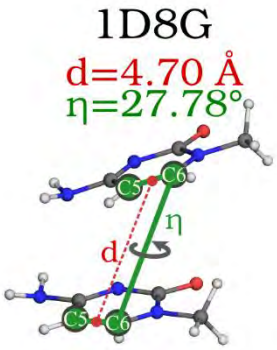


Рис. 3.1.3. Структура цитозинового димера в B форме ДНК, PDB ID: 1D8G [199].

В расчетах сравнивались методы CIS(D), ADC(2), CC2, использовались базисные наборы cc-pVDZ, TZVP, 6-311++G**, aug-cc-pVDZ и aug-cc-pVTZ. Приведенные расчеты показывали [49], что: (1) увеличение базиса и усложнение метода приводит к длинноволновому сдвигу максимума интенсивного ππ* перехода, энергия которого приближается к экспериментальным максимумам; (2) величина экситонного расщепления в спектрах димеров практически не зависит от используемых методов.

3.2. Анализ влияния конформации на спектры возбуждения стэкинг-димеров тимина.

Сначала мы получили распределение конформаций димеров тимина при различных значениях d и η для $(dT)_{18}$ олигонуклеотида методом МД. Полученные распределения показаны на рис. 3.2.1-3.2.3. Наши результаты очень похожи на результаты, полученные ранее [91, 200] с несколько иными протоколами вычислений. Количество конформаций в диапазоне d≲3,6 Å (пунктирная линия на рис. 3.2.1) составляет около 5%, что согласуется с предыдущей оценкой. Как уже было предложено [91, 200] эту долю оснований можно назвать «димеризуемыми» димерами, поскольку экспериментальный квантовый выход образования CPD также составляет несколько процентов по величине [99]. Затем мы рассчитали электронные спектры димеров в широком конформационном диапазоне.

Оказалось, что все димеры тимина, полученные из траекторий МД в пределах конформационного диапазона приблизительно d≲3,3 Å и η≲50 ° (выделенная светлая область на рис. 3.2.1), способные образовать изомер *cys-syn* [201] CPD, обладают длинноволновыми электронными переходами, сдвинутыми в красную сторону (сторону низких энергий) на величину ≥0,4 эВ от максимума поглощения канонической B-формы димера. На рисунке 3.2.4 представлены примеры двух структур, содержащих димеры тимина с уменьшенными расстояниями между основаниями, найденные в траектории MD $(dT)_{18}$.

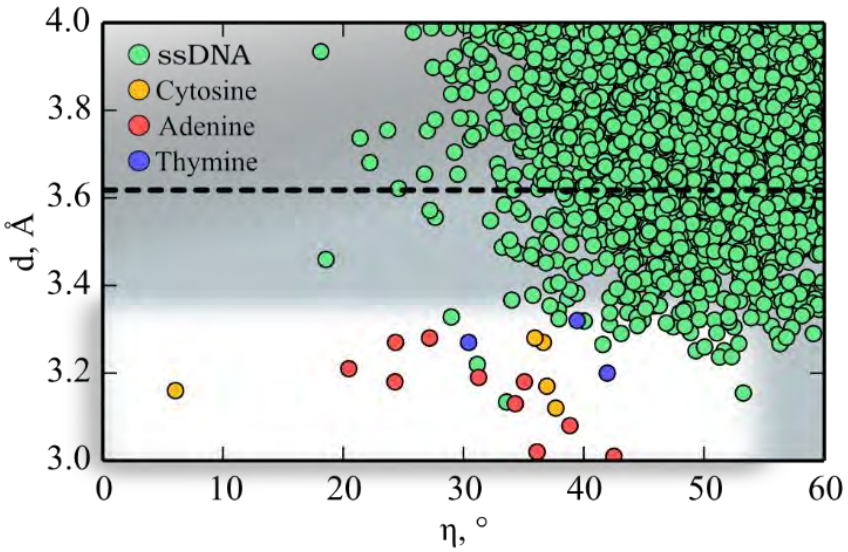


Рис. 3.2.1. Распределение димеров тимина при различных значениях d и η для $(dT)_{18}$, полученное из МД. Также нанесены точки, обозначающие d и η для выбранных димеров тимина, аденина и цитозина в неканонической геометрии стэкинга, демонстрирующие самые низкие состояния ππ *, смещенные на 0,4-0,6 эВ в красную сторону от соответствующих максимумов B-формы [49].

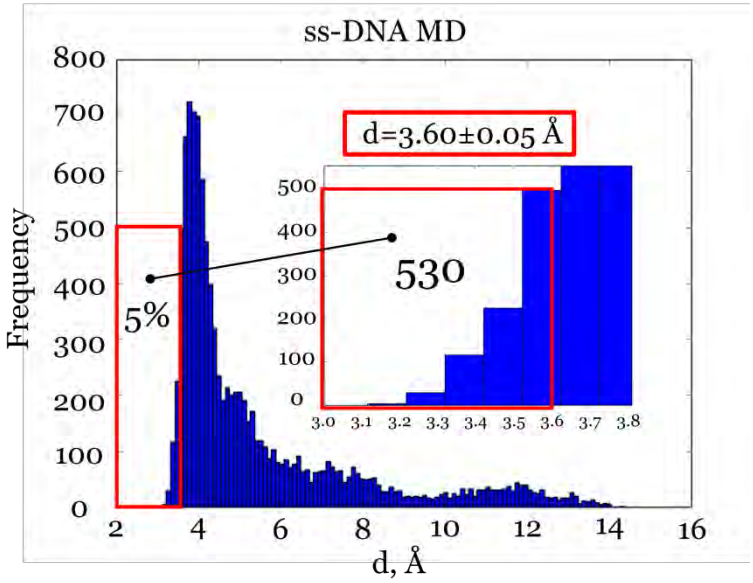


Рис. 3.2.2. Гистограмма распределения конформаций димера тимина при различных значениях d [49].

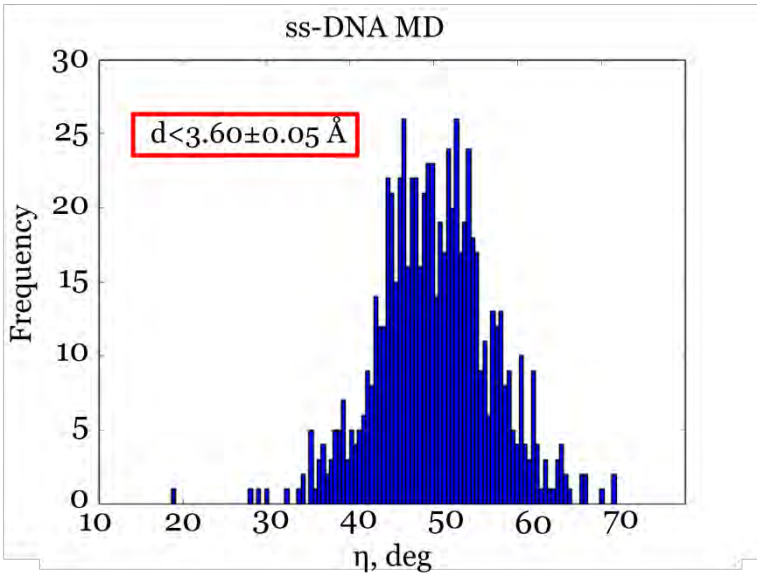


Рис. 3.2.3. Гистограмма распределения конформаций димера тимина при различных значениях η в случае d <3,6 Å [49].

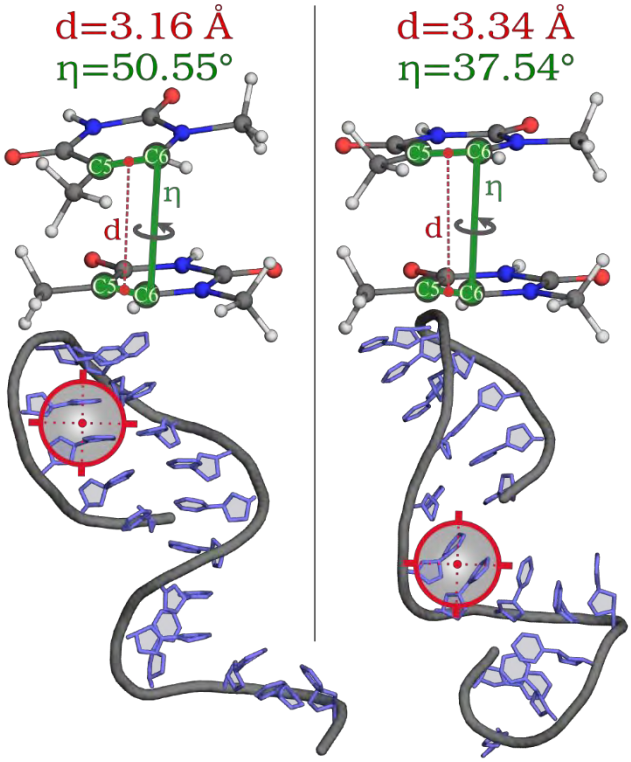


Рис. 3.2.4. Структуры димеров тимина из 196-го (слева) и 518-го (справа) кадров МД-моделирования $(dT)_{18}$ [49].

Наши расчеты показывают, что величина сдвига низко-энергетического перехода в димерах практически не зависит от используемого вычислительного подхода

(таблица 3.2.1). Хотя более сложный базис и метод вычисления имеют тенденцию сдвигать переходы к более низким энергиям, приближая таким образом положение максимума к экспериментальному значению [49], экситонное расщепление и относительный сдвиг самого низкого состояния ππ* остаются неизменными с точностью 0,05 эВ (таблица 3.2.1).

Таблица 3.2.1. Вертикальные энергии возбуждения (в эВ) для 4 самых низких возбужденных синглетных состояний тиминового мономера и димеров тимина в различных геометриях стэкинга, полученные с помощью CIS (D) (первый ряд), ADC (2) (второй ряд) и CC2 (третий ряд)) с базисом aug-cc-pVDZ, сдвиг самого низкого ππ* перехода относительно димера B-формы [49].

	nπ*	nπ*	ππ*	ππ*	Сдвиг
тимин		4.92		5.07	
		4.53		4.80	
		4.78		4.91	
1ENN	4.83	4.86	4.98	5.08	
	4.44	4.45	4.68	4.81	
	4.70	4.71	4.80	4.91	
518 кадр	4.77	4.80	4.64	5.08	0.44
из МД	4.35	4.38	4.32	4.80	0.47
	4.60	4.63	4.44	4.91	0.47
1BAE	4.74	4.76	4.69	5.08	0.39
	4.31	4.33	4.42	4.78	0.37
	4.58	4.62	4.48	4.90	0.42

В принципе, это неудивительно, поскольку ранее показывалось, что абсолютные значения расщепления в димерах с геометрией "face-to-face", рассчитанные в широком диапазоне расстояний между основаниями и углов поворота, практически не зависят от метода *ab initio*. с точностью около 0,05 эВ [60]. Мы

показываем, что относительное положение самого низкого состояния также не зависит от вычислительного подхода в широком диапазоне конформаций. Согласие с экспериментальными результатами может быть улучшено путем использования более сложного вычислительного подхода, а также с учетом взаимодействия с окружающей средой и учета колебательной структуры на спектр поглощения [28]. Как было отмечено выше, взаимодействие соседних оснований и водородные связи в дуплексе практически не влияют на положение ππ* состояний с самой низкой энергией (в пределах 0,05 эВ) [23, 27]. Расчеты QM / MM, выполненные для B-ДНК дуплексов в растворе, предсказывают смещенit спектров димеров аденина и аденин-тимина в красную сторону на величину около 0,1 эВ [94] и 0,4 эВ [28] соответственно. Однако экситонное расщепление остается тем же [94]. Разумно предположить, что окружающая среда одинаково влияет на B-форму и димеры в искаженной конформации. Такое приближение, однако, должно быть проверено дальнейшими QM / MM рассчетами. В нашем исследовании мы не включили среду в модель, так как нас интересовало влияние геометрического фактора на сдвиг низшего экситонного состояния, а не влияние среды и абсолютные значения энергий.

Рис. 3.2.5 иллюстрирует экситонное расщепление состояний тимина ππ* и nπ* в различных конформациях димера. Стоит отметить, что расщепление оказывается по существу несимметричным, что увеличивает эффект смещения низко-энергетического состояния в красную сторону. Поскольку nπ* -состояния низкой интенсивности обычно смещены в синию область в полярной среде относительно газовой фазы и не вносят существенного вклада в спектры поглощения, мы не анализируем в дальнейшем эти состояния в димерах.

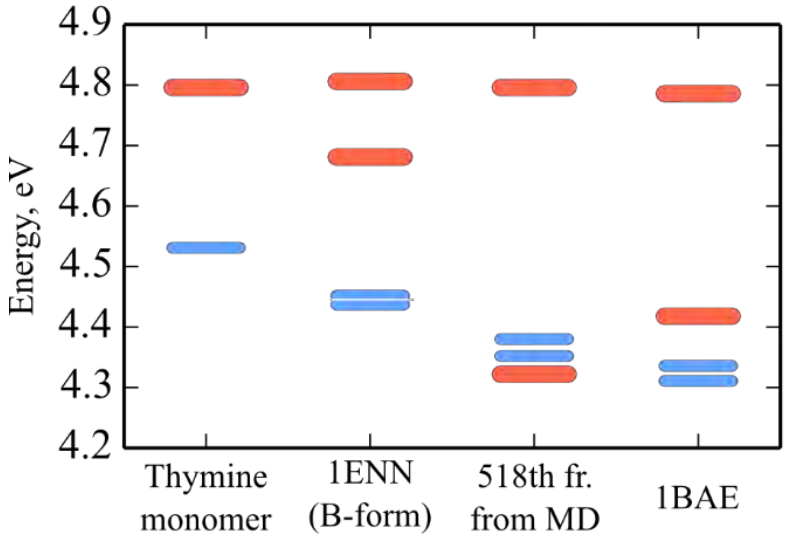


Рис. 3.2.5. Диаграмма, иллюстрирующая расщепление возбужденных состояний nπ* (синий) и ππ* (красный) в стэкинг-димерах тимина при различных геометриях по сравнению с энергиями возбужденного состояния мономера. Энергии рассчитываются методом ADC (2) / aug-cc-pVDZ [49].

Результаты МД-моделирования $(dT)_{18}$ показывают, что относительное количество тиминовых структур, имеющих ππ* переходы около 300 нм, не превышает 0,2 процента. Небольшое количество таких структур в $(dT)_{18}$, предсказанное с помощью МД-моделирования, согласуется с тем фактом, что квантовый выход образования CPD в $(dT)_{20}$ оказался практически постоянным в пределах 20% ошибки эксперимента в широком спектральном диапазоне. до 310 нм [99]. Это означает, что спектр действия в этом случае практически совпадает со спектром поглощения ДНК, что подразумевает очень незначительное количество стэкинг-структур, поглощающих при 300 нм. Это противоречит результатам, полученным в некоторых случаях для природной геномной ДНК, спектр действия CPD которой отличается от поглощения в области 300 нм, что указывает на большее количество структур, поглощающих при 300 нм. Следующим вопросом, который мы рассмотрели в нашем исследовании, было то, какие структуры в природной ДНК могли бы благоприятствовать формированию «искаженных» димеров с уменьшенным расстоянием между основаниями. В случае $(dT)_{18}$ наше моделирование предсказывает, что искаженные димеры могут образовываться на

терминальных участках, а также в изогнутых и шпилечных областях тиминовой цепи.

В базе данных PDB мы нашли несколько примеров неканонических структур, содержащих соседние тимины, демонстрирующие смещенные в красную область ππ* переходы. Димеры тимина с d≲3,3 Å и η≲50 ° (синие точки на рис. 3.2.1) обнаружены в i-мотиве 1BAE [202] (рис. 3.2.6), ДНК, содержащие неканоническое спаривание тимин-тимин (2LL9 [203], рис. 3.2.7) и AP сайт (1FZS [204], рис. 3.2.8)) выявили низколежащие ππ* состояния, смещенные в красную сторону на 0,4-0,5 эВ от максимума B-формы.

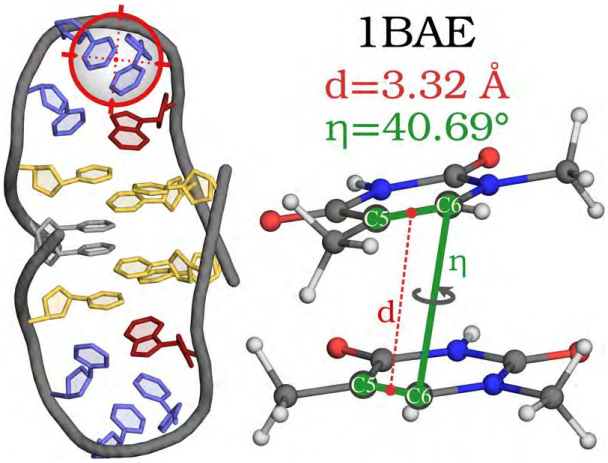


Рис. 3.2.6. Структура димера тимина в i-мотиве (PDB ID: 1BAE) [49].

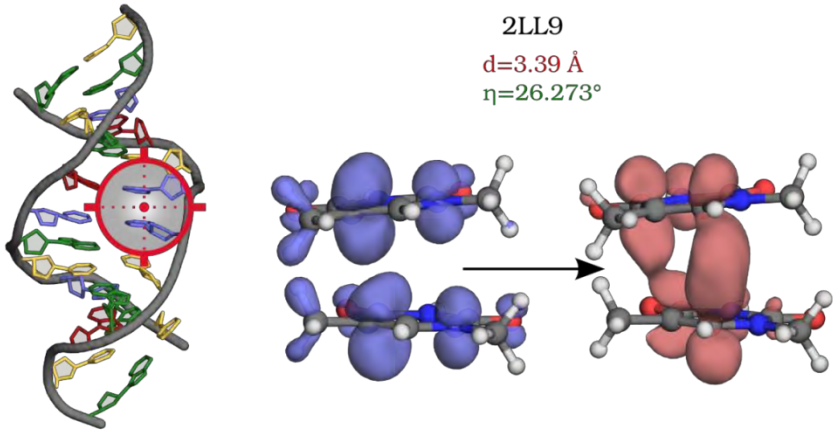


Рис. 3.2.7. Структура и разностные электронные плотности для перехода с минимальной энергией ππ * перехода димера тимина из ДНК, содержащей некомплиментарную пару (PDB ID: 2LL9). Синий – убыль, красный – увеличение электронной плотности [49].

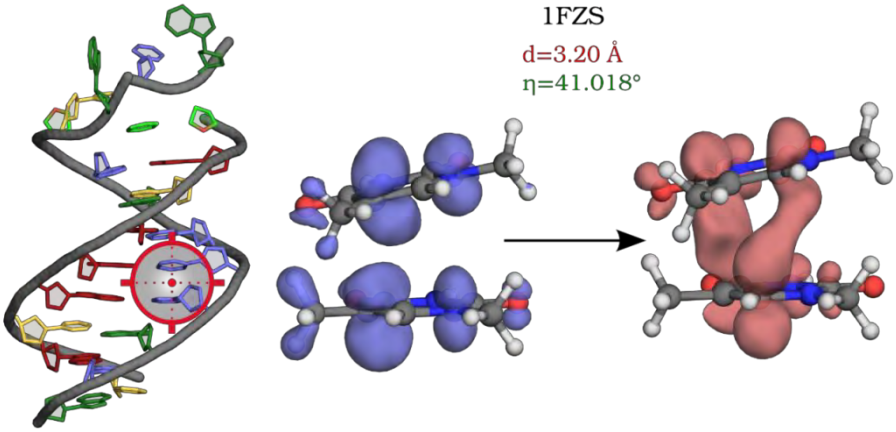


Рис. 3.2.8. Структура и разностные электронные плотности для перехода с минимальной энергией ππ* перехода димера тимина из ДНК, содержащей AP сайт (PDB ID: 1FZS). Синий – убыль, красный – увеличение электронной плотности [49].

3.3. Спектры возбуждения димеров аденина и цитозина в неканонических конформациях.

Тимин не единственная потенциальная мишень для солнечного излучения. Цитозин, хотя и в меньшей степени, также может подвергаться димеризации. Меньшая фотореактивность цитозина по сравнению с тимином объясняется наличием стабильных эксимероподобных состояний ниже конического пересечения S1/S0 (CI) [205]. Хотя CPD, а также аддукты пиримидин (6-4) пиримидона [14] (с 10-кратным снижением выхода) являются наиболее частыми поражениями в ДНК, прямое поглощение земного солнечного излучения в диапазоне UVB также может привести к другим фотопродуктам и фотохимическим реакциям в ДНК и РНК. Например, аденин может образовать димеры [206]. УФ-индуцированное образование 8-гидрокси-дезоксигуанозина в ДНК (но не в гуанине) также наблюдалось [207]. Недавно было показано, что стэкинг и спаривание оснований могут привести к фотоиндуцированному переносу электронов и протонов [208, 209]. Таким образом, возможные

фотохимические события в ДНК не ограничиваются пиримидиновыми основаниями. В связи с этим интересно исследовать спектры других димеров нуклеиновых оснований. Мы изучали димеры цитозина и аденина, которые также способны образовывать фотопродукты при прямом УФ-поглощении в структурах ДНК и РНК.

Наблюдаемые низко-энергетические переходы в искаженных стэкинг-конформациях оснований не являются уникальной особенностью тиминовых оснований в ДНК. Другие основания в неканонических структурах ДНК / РНК могут проявлять аналогичный эффект. Красные и желтые точки на рис. 3.2.1 обозначают димеры аденина и цитозина соответственно в структурах ДНК/РНК, полученных из базы данных PDB, и имеют геометрию, которая находится в пределах диапазона d и η, определенного выше.

Таблица 3.3.1. Энергии (в эВ) для 6 самых низких возбужденных синглетных состояний мономера аденина и димеров аденина в различных сэкинг-геометриях, полученных с помощью CIS (D) (первая строка), ADC (2) (вторая строка) и CC2 (Третья строка) с базисом aug-cc-pVDZ, экситонное расщепление и сдвиг самого низкого ππ* состояния относительно димера B-формы [49].

	nπ*	nπ*	ππ*	ππ*	ππ*	ππ*	ΔE	Сдвиг
Мономер		5.52			5.28	5.29		
		4.96			5.01	5.07		
		5.05			5.11	5.11		
1SK5	5.42	5.43	5.13	5.26	5.27	5.29	0.16	
	4.89	4.92	4.83	4.96	5.02	5.05	0.21	
	4.98	5.01	4.92	5.06	5.07	5.09	0.18	
1OLD	5.15	5.22	4.82	5.22	5.25	5.28	0.46	0.47
	4.75	4.81	4.50	4.90	4.93	5.04	0.54	0.55
	4.83	4.89	4.57	4.92	5.09	5.11	0.54	0.53

На рис. 3.3.1 (слева) показаны шпилечный ДНК-аптамер 1OLD [210] , содержащий димер аденина с необычной геометрией укладки по сравнению с димером B-формы, и (справа) комплекс лиганд-ДНК 2PIK [211], содержащий искаженные димеры цитозина. Возбужденные состояния, рассчитанные для димеров, представлены в таблицах 3.3.1 и 3.3.2 по сравнению с соответствующими B-формами димеров. Как и в случае димеров тимина, в спектрах наблюдаются низколежащие экситонные переходы, значительно смещенные в красную область на приблизительно. 0,5 эВ от соответствующих максимумов B-формы.

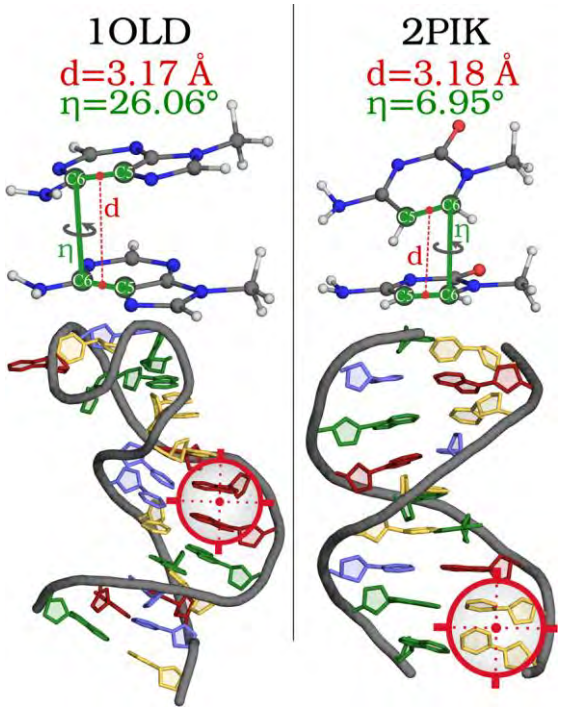


Рис. 3.3.1. Структуры димеров аденина (слева) и цитозина (справа) в неканонических структурах из базы данных PDB [49].

Таблица 3.3.2. Энергии (в эВ) для 4 самых низких возбужденных синглетных состояний цитозинового мономера и димеров цитозина в различных геометриях стэкинга, полученных с помощью CIS (D) (первая строка), ADC (2) (вторая строка) и CC2 (третья строка) и базиса aug-cc-pVDZ, экситонное расщепление и сдвиг самого низкого ππ* состояния относительно димера B-формы [49].

	nπ*	nπ*	ππ*	ππ*	ΔE	Сдвиг
Мономер		5.10		4.59		
		4.63		4.35		
		4.83		4.53		
1D8G	5.00	5.01	4.52	4.56	0.04	
	4.45	4.51	4.26	4.30	0.04	
	4.68	4.72	4.45	4.49	0.04	
2PIK	4.75	4.96	4.22	4.65	0.43	0.34
	4.38	4.44	3.97	4.29	0.32	0.33
	4.60	4.66	4.14	4.49	0.35	0.35

3.4. Природа низко-энергетических состояний.

Как уже отмечалось выше, состояния с переносом заряда (ПЗ) не влияют на длинноволновую часть спектра поглощения ДНК [23-28]. Тем не менее, мы рассмотрели вопрос о том, вносят ли ПЗ-взаимодействия вклад в низкоэнергетические состояния в димерах с уменьшенными расстояниями между основаниями.

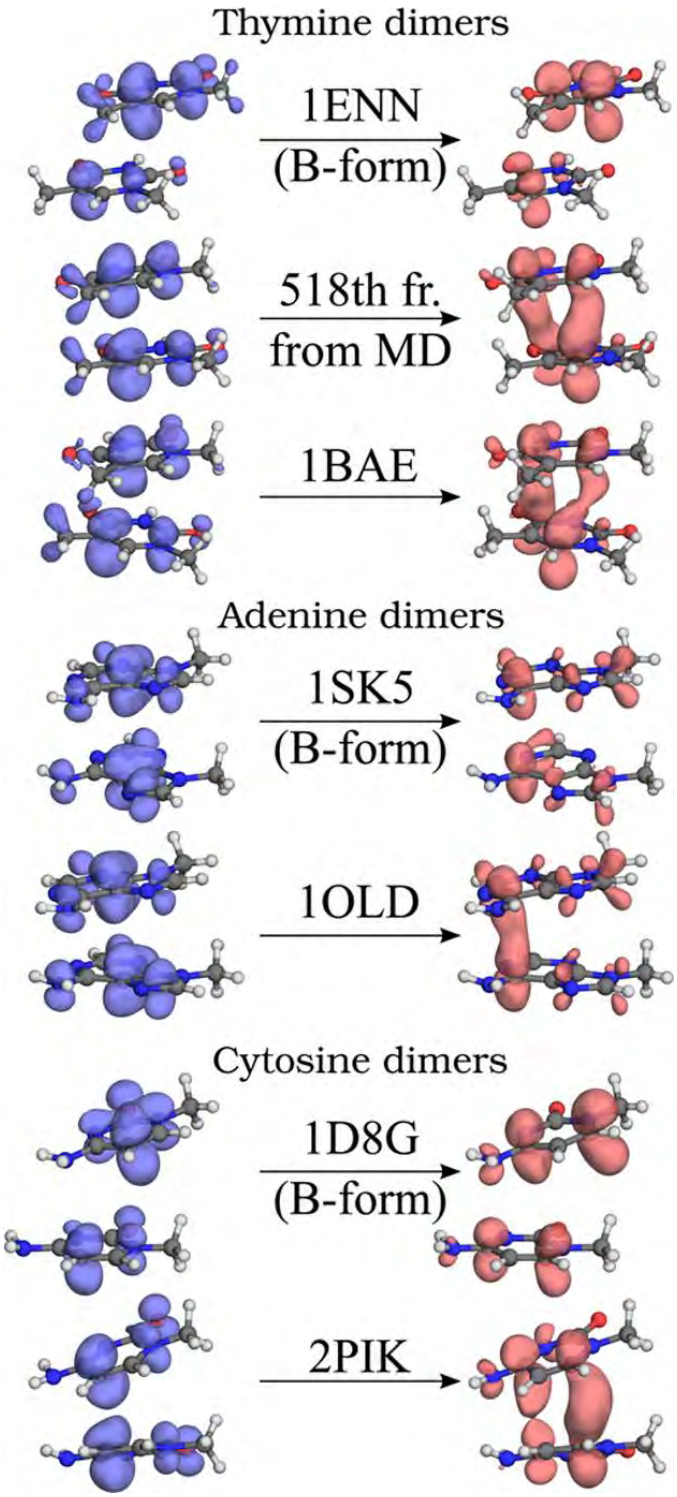


Рис. 3.4.1. Перераспределение электронных плотностей для самых низких ππ* состояний димеров тимина, аденина и цитозина при разных геометриях [49].

Табл. 3.4.1. Энергии возбуждения (E, eV), сила осциллятора (f), статистические дескрипторы и типы переходов в димерах тимина, аденина и цитозина в различных геометриях. Расчеты выполнены методом ADC(2) / aug-cc-pVDZ [49].

Тип	E(эВ)	F	PR	CT	CTnt
TT B-form 1ENN					
nπ *	4.44	0.00	0.99	-0.02	0.04
nπ *	4.45	0.00	0.97	-0.04	-0.05
ππ *	4.68	0.15	1.03	-0.03	-0.06
ππ *	4.81	0.24	0.98	-0.08	0.12
TT 1BAE					
nπ *	4.31	0.00	1.21	0.09	0.02
nπ *	4.33	0.01	1.34	0.20	0.02
ππ *	4.42	0.03	1.98	0.15	-0.01
ππ *	4.78	0.29	1.98	-0.03	0.02
TT 518th frame from MD					
nπ *	4.35	0.01	1.97	0.06	-0.02
nπ *	4.38	0.01	1.63	0.02	0.10
ππ *	4.32	0.01	1.79	0.11	-0.02
ππ *	4.80	0.31	1.98	-0.04	0.03
AA B-form 1SK5					
nπ *	4.89	0.02	1.53	0.05	0.03
nπ *	4.92	0.02	1.90	0.13	0.01
ππ *	4.83	0.04	1.92	0.09	0.04
ππ *	4.96	0.22	1.98	0.12	-0.04
ππ *	5.02	0.01	1.82	0.18	0.10
ππ *	5.05	0.11	1.67	0.29	0.00

AA 1OLD					
nπ *	4.75	0.02	1.90	0.36	-0.17
nπ *	4.81	0.01	1.23	0.20	0.05
ππ *	4.50	0.02	1.95	0.42	-0.16
ππ *	4.90	0.15	1.87	0.40	-0.24
ππ *	4.93	0.02	1.94	0.42	-0.17
ππ *	5.04	0.17	1.97	0.13	0.13
CC B-form 1D8G					
nπ *	4.45	0.00	1.06	0.05	0.05
nπ *	4.51	0.00	1.10	0.08	-0.06
ππ *	4.26	0.04	1.25	0.00	0.00
ππ *	4.30	0.09	1.24	0.01	0.02
CC 2PIK					
nπ *	4.38	0.00	1.03	0.03	0.02
nπ *	4.44	0.00	0.98	-0.02	0.03
ππ *	3.97	0.00	1.98	0.18	-0.09
ππ *	4.29	0.11	1.96	-0.05	-0.01

Чтобы исследовать природу переходов, мы провели анализ перераспределения электронной плотности при переходе в возбужденное состояние и выполнили анализ структуры низколежащих возбужденных состояний в исследованных структурах с использованием дескрипторов, предложенных в работе [212]. Как видно из карт перераспределения плотности (Рис. 3.4.1), состояния ππ* с самой низкой энергией во всех искаженных димерах делокализованы по двум основаниям, как в случае димеров B-формы, и переходы в основном ππ * экситонного характера. Значения коэффициента участия (PR), т. е. числа когерентно связанных хромофоров, близких к 2, подтверждают этот вывод (таблица 3.4.1). Небольшое перекрытие плотностей в случае искаженных димеров

указывает на возможный вклад членов с переносом заряда или зарядовым резонансом. Подробное описание структуры возбужденных состояний действительно показывает, что взаимодействия с переносом заряда вносят незначительный вклад в самые низкие состояния ππ* (табл. 3.4.1). Это видно по увеличению значений CT до примерно 0,1-0,2 для структур тимина и цитозина и до 0,4 для димера аденина 1OLD. Однако для димеров тимина и цитозина нетто сдвиг заряда (CTnt) остается незначительным, что свидетельствует о резонансе заряда, а не о переносе заряда. Для димера 1OLD аденина значения CT и CTnt указывают на то, что и зарядовый резонанс и перенос заряда частично вносят вклад в самое низкое состояние ππ*. Приведенный выше анализ показывает, что значительное красное смещение низкоэнергетических переходов в искаженных конформациях стэкинга оснований относительно B-формы ДНК, очевидно, вызвано усилением экситонного взаимодействия из-за уменьшения расстояния между основаниями. На вклад ПЗ и зарядово-резонансных взаимодействий могут влиять окружение и взаимодействия с соседними основаниями [28]. Эти вероятные эффекты следует дополнительно изучить в дальнейшем, поскольку они могут влиять на спектры неканонических конформаций димеров.

3.5. Параметр эффективности взаимодействия с солнечной радиацией для димеров в неканонических структурных формах и горячие точки образования фотодимеров в ДНК.

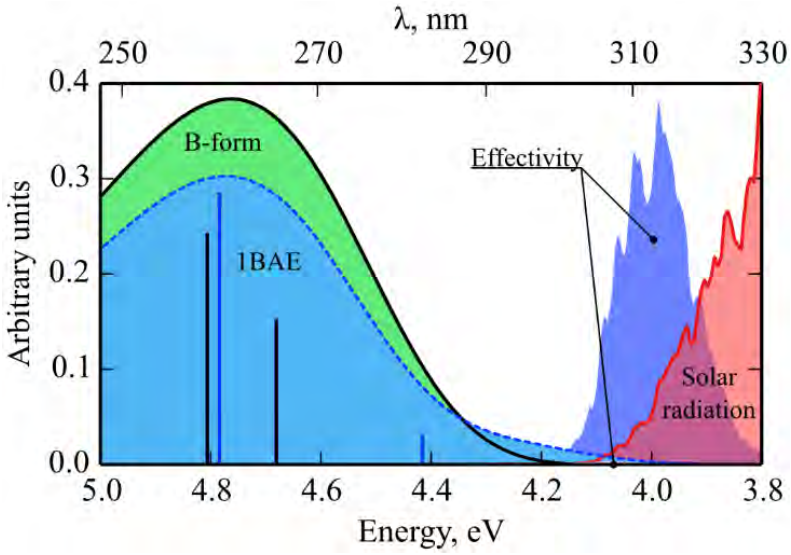


Рис. 3.5.1. Спектры поглощения димеров тимина в B-форме (PDB ID: 1ENN) и неканонической стекинг-геометрии (PDB ID: 1BAE), полученные методом ADC (2) / aug-cc-pVDZ, после конволюции со спектром поглощения мономера (вертикальные палочки указывают положения ππ * -состояний), спектры эффективности, полученные как произведения спектров поглощения и спектра солнечного излучения [49].

Для сравнения интегральной скорости поглощения земного солнечного излучения для оснований, находящихся в разных геометриях стэкинга, вибронная структура спектров (вызывающая значительное уширение [28]) была смоделирована путем свертки спектров, полученных методом ADC(2) / cc-pVDZ с экспериментальным спектром поглощения тимина. Типичный спектр искаженного димера тимина (1BAE) по сравнению с димером B-формы показан на рис. 3.5.1. Качественно разница между спектрами поглощения B-формы и искаженного димера аналогична разнице, наблюдаемой между спектром действия CPD и спектром поглощения поли (dT), показанными на рис. 1.1.13. Длинноволновый хвост хорошо виден в спектре поглощения искаженного димера

по сравнению с каноническим димером. Растущая интенсивность солнечного излучения в этом спектральном диапазоне обеспечивает значительное увеличение относительного количества фотонов, поглощаемых искаженными димерами тимина, и, следовательно, их относительно высокую чувствительность к излучению. Количественно это хорошо видно из сравнения спектров эффективности, полученных для B-формы и искаженных димеров, путем умножения соответствующих спектров поглощения и спектра солнечного излучения (рис. 3.5.1). Интегральная эффективность, то есть скорость поглощения, в случае искаженного димера приблизительно. на два порядка выше, чем у димера B-формы. Конечно, более детальное описание вибронных переходов и воздействий окружающей среды может изменить соотношение эффективности. Однако можно полагать, что качественно разница между димером B-формы и димером с уменьшенным расстоянием между основаниями останется неизменной.

Скорость поглощения, которая резко увеличивается в искаженных димерах, не является единственным фактором, влияющим на чувствительность структур ДНК к солнечному излучению. Скорость фотохимической реакции является продуктом как скорости поглощения, так и квантового выхода. Как экспериментальные [90, 213], так и теоретические [93, 214, 215] исследования предполагают, что эффективность (квантовый выход) образования CPD сильно зависит от конформации, в то время как растворитель не влияет на фотореактивность. Фотодимеризация протекает через синглетное возбужденное состояние в конфигурации вблизи геометрии конического пересечения (S0/S1-CI). Незначительный выход образования CPD в ДНК из триплетного состояния, вероятно, также возможен, так как это происходит в растворе тимина [216]. Триплетный механизм, вероятно, становится важным в диапазоне UVA, где сенсибилизированные фотореакции посредством триплет-триплетной передачи энергии, вероятно, являются доминирующими. Конформационный диапазон для димеризации тимина не совсем понятен. Теоретические QM исследования предсказывают, что CI может быть достигнуто при d <3,6-4 Å [93], что близко к эмпирическим оценкам моделирования методами MD [91, 200]. Моделирование

MD также предсказывает, что предел для двугранного угла составляет 30-50 °. Однако расчеты QM показывают, что образование димера может протекать при значительно более высоких значениях. Поскольку конформации димеров со значительно смещенными переходами, по-видимому, находятся в пределах предсказанного диапазона для димеризуемых димеров, представляется разумным предположить, что квантовый выход в димерах с необычной геометрией стэкинга с $d<3,3$ Å и $\eta \lesssim 50$ ° может быть, по меньшей мере, не меньше, чем для основной части димеризуемых димеров, имеющих спектр поглощения, близкий к спектру B-формы. В этом случае полученные выше спектры эффективности отражают действительно гораздо более высокую чувствительность к солнечному излучению для искаженных стэкинг-димеров, обнаруженных в некоторых неканонических структурах ДНК.

Многие экспериментальные исследования показали, что вызванные ультрафиолетом повреждения ДНК распределены не случайно в ДНК. Было показано, что образование фотопродуктов сильно зависит от последовательности и конформации [18, 100-107]. Большинство исследований были выполнены для UVC спектрального диапазона. Однако эффективность фотоповреждений, вызванных UVC радиацией, в некоторых случаях отличается от результатов, полученных при облучении в UVB и SSL спектральных диапазонах [102-104]. Наши данные могут объяснить происхождение наблюдаемых эффектов и предсказать потенциальные горячие точки образования фотопродуктов в ДНК. Как следует из наших расчетов, конформации с уменьшенным расстоянием между основаниями в пределах конформационного диапазона $d \lesssim 3,3$ Å и $\eta \lesssim 50$ °, по-видимому, гораздо более чувствительны к солнечному излучению из-за значительного экситонного расщепления и, следовательно, наличия низколежащих $\pi\pi^*$ состояний в этих структурах по сравнению с B-формой. Такие структуры являются, очевидно, предпочтительными мишенями для солнечного излучения у поверхности Земли. В диапазоне UVC, где спектральная разница между конформационными структурами не является существенной, фотохимическая селективность искаженных стэкинг-димеров может быть вызвана

их низколежащими возбужденными состояниями, служащими ловушкой для передачи энергии возбуждения от соседних оснований. Эффект переноса энергии также может быть важен в диапазоне UVB, особенно в случае, когда сила осциллятора самого низкого состояния оказывается достаточно низкой.

Редкие формы стэкинга оснований с заметным поглощением в области 290-300 нм из-за большого экситонного расщепления наблюдались в наших самых ранних экспериментальных исследованиях [65, 95, 96]. Как и в случае с наиболее димеризуемыми димерами тимина, поглощающими в длинноволновом спектральном диапазоне, что видно из спектра действия на рис. 3.5.1, в спектрах флуоресцентного возбуждения полимерных форм наблюдались редкие формы стэкинга оснований со значительным поглощением выше 290 нм благодаря их относительно высокому квантовому выходу по сравнению с основной долей оснований. Сравнение спектров эффективности для канонических и искаженных димеров (рис. 3.5.1) предсказывает, что такие искаженные стэкинг-конформации могут быть биологически значимыми при концентрациях выше ~ 1% по отношению к общему количеству оснований, которые могут подвергаться данному фотохимическому повреждению с тем же квантовым выходом. Например, в случае олигонуклеотида тимина концентрация всех димеризуемых тиминов составляет около 5%. Предполагаемое количество конформаций с переходами, сдвинутыми в красную зону, составляет приблизительно 0,2%. Такого количества достаточно для того, чтобы при 100-кратном более высоком поглощении 80% CPD были образованы тиминами, находящимися в искаженных конформациях.

Концентрация оснований с такой искаженной геометрией стэкинга в ДНК, очевидно, определяется их вторичной структурой. Выявление структур, в которых могут быть реализованы такие искаженные стэкинг-димеры, имеет большое значение для определения горячих точек образования CPD и других фотопродуктов. Наши наблюдения показывают, что димеры с уменьшенными расстояниями между основаниями наиболее часто наблюдаются в изогнутых и шпилевидных структурах ДНК. Это согласуется с некоторыми

экспериментальными данными о том, что образование фотопродуктов увеличивается в месте излома ДНК [100]. Развертывание ДНК во время репликации обеспечивает определенную гибкость оснований, позволяя им формировать стэкинг-структуры с уменьшенными расстояниями между основаниями. Тем не менее, значительные локальные конформационные отклонения могут также возникать даже в двухцепочечной B-форме ДНК, что является результатом так называемых эффектов последовательнности, как это имеет место в случае структуры 1ZF0 [49], которая содержит димер аденина со значительно смещенным в красную сторону ππ* состоянием [49]. В других структурах, изученных в работе [49], где расстояние между основаниями оказалось меньше 3,3 A, нативная B форма была нарушена взаимодействием с лигандами (2PIK) или некомплиментарными парами (2LL9, 1FZS). В этом отношении можно заметить, что экспериментальные результаты показали, что горячие точки для УФ-индуцированного образования CPD *in vivo* были сконцентрированы в сайтах связывания транскрипционных факторов [101], где нативная B-форма может быть искажена взаимодействием с белками. Следует также отметить, что некоторые из димеров с ππ* -состоянием, смещенным в красную сторону, наблюдались в концевых участках ДНК. В случае клеточной ДНК терминальные сайты могут образовываться из-за разрывов нитей, которые могут происходить в результате различных повреждений ДНК и других процессов в живых клетках.

Во многих случаях наблюдается зависимость эффективности образования фотопродуктов от длины волны [102-104]. В некоторых случаях это объяснялось красным смещением спектра поглощения метилцитозина по сравнению с тимином [104, 105]. Наблюдаемые в нашем исследовании длинноволновые переходы в искаженных стэкинг-структурах могут быть еще одним фактором, приводящим к разнице между фотохимией в UVB и UVC областях. Эти искаженные стэкинг-структуры, как следует из их электронных спектров, наиболее чувствительны к солнечному излучению. Детальный структурный анализ и расчеты спектров наряду с фотохимическими исследованиями могут быть полезны для выявления

потенциальных «горячих точек» в ДНК. Стоит также отметить, что распределение фотопродуктов в ДНК, вызванных естественной солнечной радиацией со значительной интенсивностью на 300 нм, может быть совершенно иным чем в модельных экспериментах с использованием UVC излучения.

3.6. Спектры поглощения структуры i-motif ДНК.

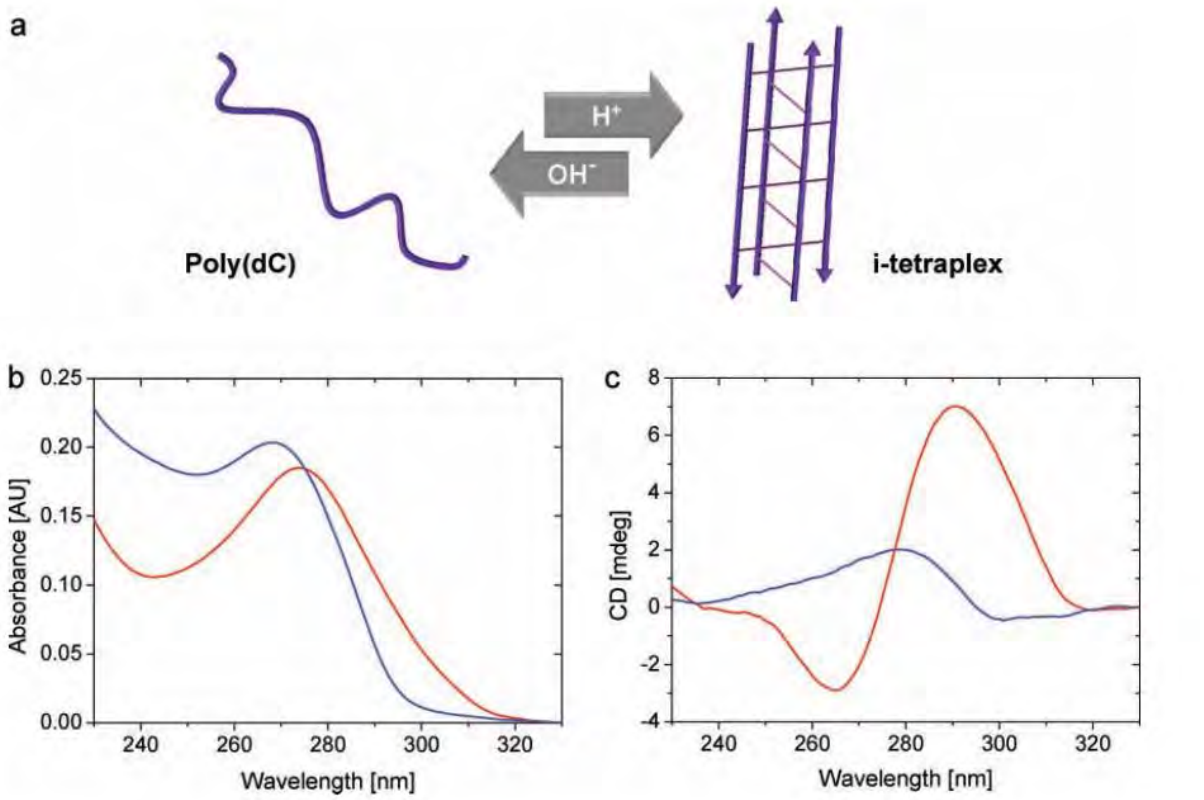


Рис. 3.6.1. a) Схематическое изображение полицитозиновой цепочки поли-(dC) при высоком и низком pH. При высоком pH полинуклеотид находится в односпиральной конформации, при слабом кислотном pH происходит образование i-мотива, состоящего из двух интеркалированных дуплексов поли-(dC); b) Спектр поглощения; c) CD-спектры поли-(dC) в 0,1 M NaOH (синий) и в трис-ацетате при pH 4,5 (красный) [218].

В п. 3.5 наличие длинноволновых электронных переходов, заметно смещенных в красную сторону, в некоторых неканонических формах стэкинга были предсказаны с помощью расчетов QM. Было также показано, что экситонный член является доминирующим в электронных низкоэнергетических состояниях в таких формах стэкинга. Обычно такие переходы не видны в спектрах поглощения нуклеиновых кислот, но в некоторых случаях могут наблюдаться в спектрах возбуждения флуоресценции [65, 96]. В этом отношении i-мотив, по-видимому, представляет собой уникальную структуру ДНК с сильным красным смещением низколежащего электронного возбужденного состояния, которое видно по спектру поглощения (рис. 3.6.1).

i-мотив - неканоническая форма ДНК, возникающая в цитозиновых (C) участках ДНК, как правило при низком pH, C-тетраплекс [217]. При этом, цитозиновые цепочки образуют структуру из двух параллельных цепочек полупротонированных цитозиновых дуплексов, образующих пары C^{+}-H···C и интеркалированных друг в друга. Геометрия структуры i-мотива существенно отличается от двуцепочечных A- и B-форм ДНК. Схематично она показана на рис. 3.6.1а [218]. Эксперименты in vitro показывают, что участки геномной ДНК, богатые цитозином, могут образовать i-мотив и значениях при значениях pH близких к нейтральным [218-221]. При этом, спектр поглощения i-мотива и его спектр КД существенно отличается от B-формы ДНК (рис. 3.6.1б).

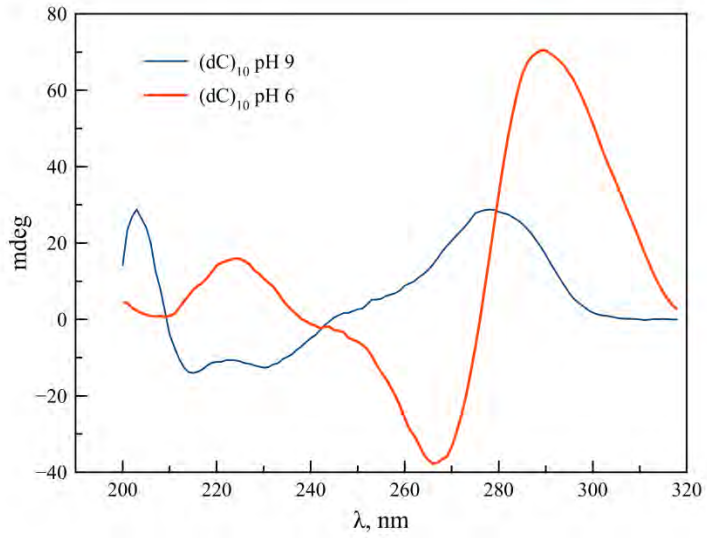


Рис. 3.6.2. КД спектры $(dC)_{10}$ при pH 6 и 9 [58].

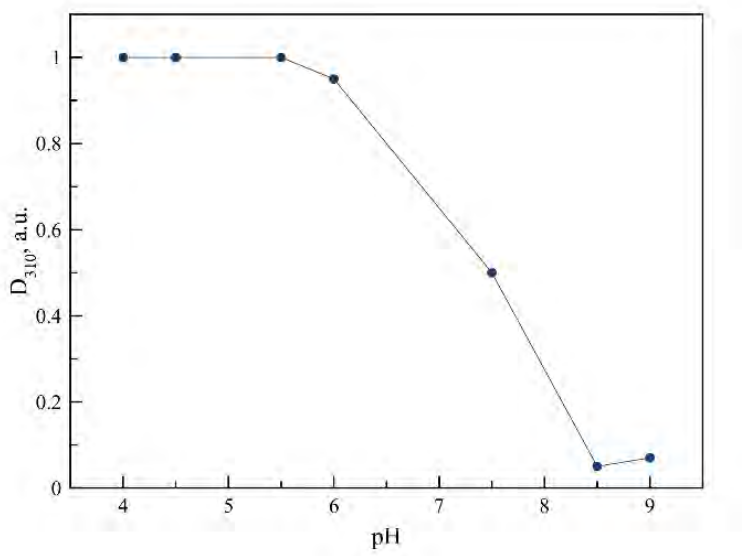


Рис. 3.6.3. УФ кривые титрования $(dC)_{10}$, λ=310 nm [58].

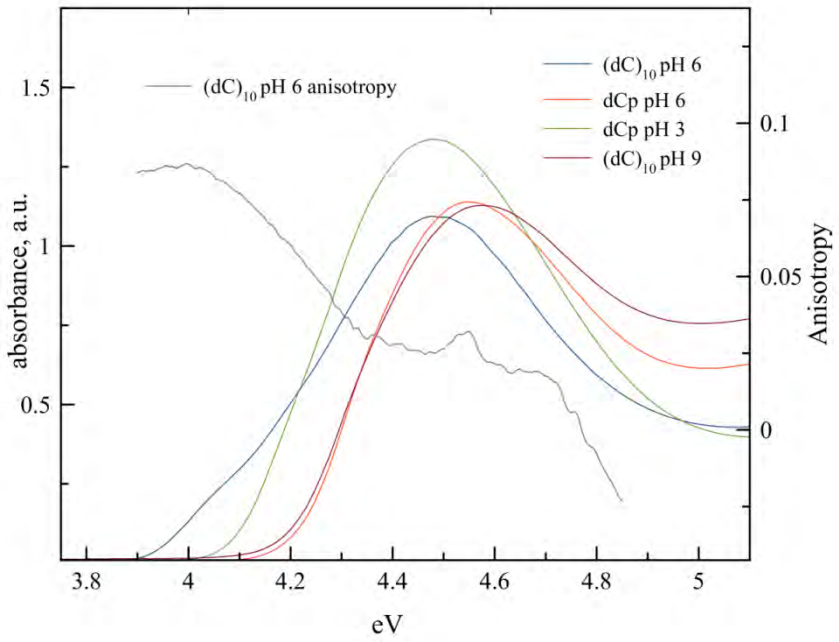


Рис. 3.6.4. Спектры поглощения и анизотропии флуоресценции (λ_{em} = 400 nm) dCp и $(dC)_{10}$ при различных pH [58].

Мы исследовали образование i-мотива в олигонуклеотиде $(dC)_{10}$ [58]. В воде (pH 6) $(dC)_{10}$ находится в полупротонированной конформации с парой C^{+}-H···C, что видно из спектра CD (рис. 3.6.2), характерного для полупротонированных цепочек цитозина [218-221] Это приводит к образованию так называемого i-

мотива (i-$(dC)_{10}$). При pH 9, $(dC)_{10}$ находится в нейтральной одноцепочечной конформации, ss-$(dC)_{10}$, рис. 3.6.2. Значение pKa для олигонуклеотида увеличивается до 7 по сравнению с мономером pKa 4.2 [218]. УФ-титрование $(dC)_{10}$ дает то же самое pKa 7 (рис. 3.6.3).

Спектры поглощения дезоксицитидин-фосфата (dCp) и двух форм $(dC)_{10}$ представлены на рис. 3.6.4. В то время как спектр поглощения одноцепочечной конформации $(dC)_{10}$ очень близок к спектру мономера dCp при нейтральном pH, спектр поглощения полупротонированной структуры i-мотива отличается как от нейтрального, так и от протонированного (pH 3) спектров dCp. Спектр имеет плечо около 4 эВ, что указывает на низкоэнергетический электронный переход. Сложная структура всей полосы поглощения также подтверждается кривой анизотропии возбуждения флуоресценции, указывающей на наличие по меньшей мере двух электронных переходов в пределах УФ-полосы. По сравнению с ss-$(dC)_{10}$ такое поведение спектра поглощения i-$(dC)_{10}$, по-видимому, является проявлением сильных экситонных взаимодействий. Консервативный спектр CD i-$(dC)_{10}$ также является следствием экситонного взаимодействия. Расщепление экситонов в спектре поглощения структуры i-мотива можно приблизительно оценить как ~ 0,4 эВ (разница между положениями максимума и плеча в спектре), что в несколько раз превышает типичные значения в ДНК [27, 94]. В принципе, экситон, а также члены с заряд-резонансом и переносом заряда могут участвовать в электронном переходе в длинноволновом хвосте спектра. Детальное описание структуры возбужденных состояний в i-$(dC)_{10}$ требует QM расчетов.

Мы рассчитали спектр поглощения полупротонированного тетрамера, полученного из кристаллической структуры i-мотива 1ELN, взятой из базы данных PDB [222] (рис. 3.6.5). Геометрия полупротонированного тетрамера цитозина ($Cyt_4 2H^+$, показанного на рис. 3.6.5) была построена путем сначала оптимизации мономеров, а затем вставки их в исходную геометрию тетрамера в i-мотиве.

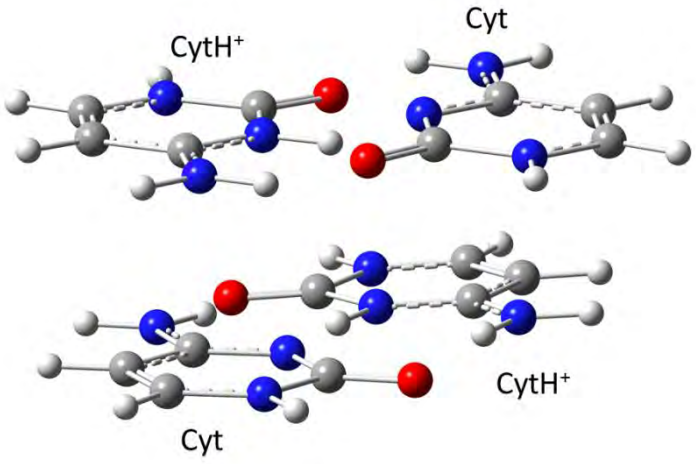
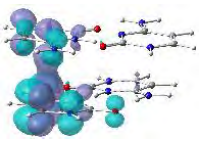
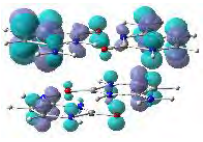
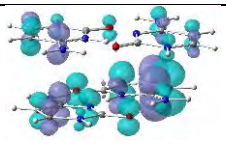
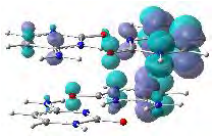
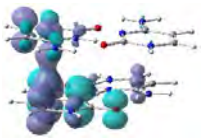
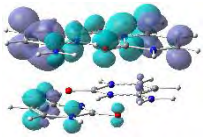


Рис. 3.6.5. Структура тетрамера i-мотива, использованная в рассчетах [58].

Таблица 3.6.1. Энергии вертикальных переходов (эВ) с силами осцилляторов (в скобках) нейтрального (Cyt) и протонированного ($CytH^+$) цитозина, а также полупротонированного тетрамера i-мотива ($Cyt_4 2H^+$) с учетом растворителя в модели COSMO. Изменение зарядовой плотности (CDD) для электронных переходов, где темный и светлый цвета обозначают дырку и электрон соответственно [58].

состояние/тип	CDD \ структура	$Cyt_4 2H^+$	Cyt	$CytH^+$
S_1 (ππ*)		4.27 (0.012)		
S_2 (ππ*)		4.48 (0.008)		
S_3 (ππ*)		4.56 (0.422)		4.59 (0.265)

S_4 (ππ*)		4.64 (0.051)	4.75 (0.126)	
S_5 (ππ*)		4.93 (0.239)	5.40 (0.224)	
S_6 (ππ*)		5.09 (0.051)		
S_7 (ππ*)		5.19 (0.007)		
S_8 (ππ*)		5.24 (0.007)		
S_9 (ππ*)		5.32 (0.010)		
S_{10} (nπ*)		5.37 (0.013)		
S_{11} (nπ*)		5.42 (0.026)		
S_{12} (ππ*)		5.44 (0.015)		
ππ*				5.95 (0.120)
nπ*			5.51 (0.003)	6.10 (0.000)

Спектры протонированных и нейтральных мономеров и полупротонированного i-мотива показаны на рис. 3.6.6 и в таблице 3.6.1. Рассчитанные спектры i-мотива и нейтральных и протонированных мономеров качественно воспроизводят относительные положения максимумов и интенсивности в экспериментальных спектрах поглощения, показанных на рис. 3.6.4. В целом, рассчитанные максимумы смещены в коротковолновую сторону на 0,1 эВ относительно экспериментальных максимумов. Лучшее количественное согласие с экспериментальными спектрами, вероятно, можно достичь с использованием явного растворителя. Протонированные и нейтральные мономеры имеют нижние

S_1 ππ* переходы при 4,59 и 4,75 эВ соответственно, которые расщепляются на ππ* состояния в тетрамере. Разностные зарядовые плотности (CDD [223]), представленные в таблице 3.6.1, показывают, что эти состояния делокализованы по двум-четырем мономерам и имеют экситонный характер с некоторой примесью состояний переноса заряда (CT) или зарядового резонанса (CR). Более подробный анализ требует дополнительных расчетов. Важно, что в i-мотиве самый низкий ππ* переход смещен в красную сторону на 0,3 эВ от максимума из-за значительного экситонного взаимодействия. Для сравнения, типичные значения расщепления экситонов в B-форме ДНК составляют менее 0,1 эВ. [27, 94]. Большое значение этого сдвига, рассчитанное для i-мотива, согласуется с тем, что наблюдается в экспериментальном спектре поглощения i-$(dC)_{10}$. Последний демонстрирует выраженный низкоэнергетический переход (ы) около 4,1 эВ (рис. 3.6.4).

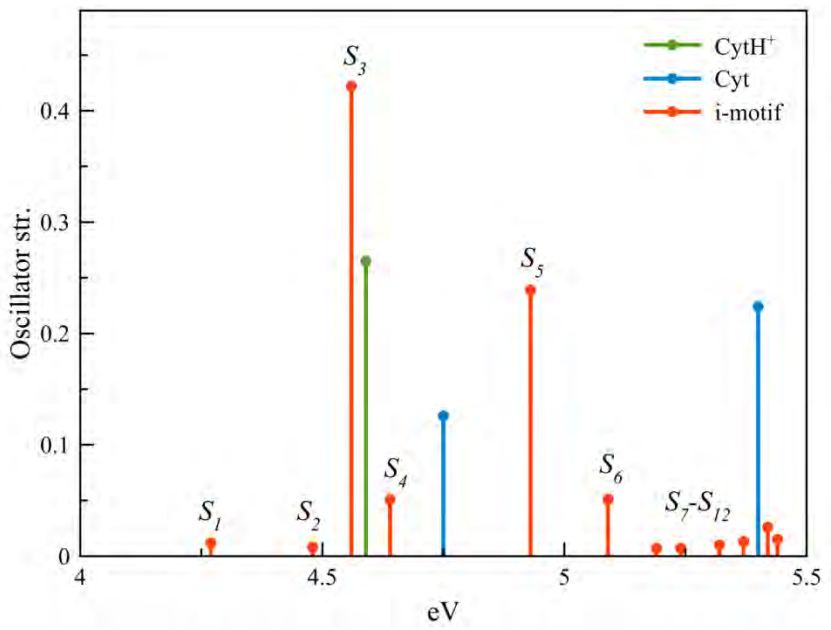


Рис. 3.6.6. Спектры протонированных и нейтральных цитозиновых мономеров и тетрамера цитозина, полученных из структуры i-мотива на основе PDB [58].

3.7. Выводы к главе 3.

Стэкинг-структуры азотистых оснований с геометрией, определяемой расстоянием между серединами связей C5-C6 ≲3.3Å и дигедральным углом C5-C6- C6-C5 ≲ 50° обнаруживают низколежащие ЭВС экситонной природы в области 300 нм спектра возбуждения ДНК. Эти структуры являются наиболее эффективными центрами (*hot spots*), взаимодействующими с земной солнечной радиацией, интенсивность которой резко возрастает в области длин волн >300 нм. Конформационный анализ показывает, что данные стэкинг-структуры с наибольшей вероятностью реализуются в неканонических спиральных формах ДНК и РНК. В неканонической структуре i-мотива также присутствует низкоэнергетический переход экситонной природы в области 300 нм, наблюдаемый в экспериментальных спектрах.

ГЛАВА 4. ДИНАМИКА ЭЛЕКТРОННО-ВОЗБУЖДЕННЫХ СОСТОЯНИЙ В РАЗЛИЧНЫХ СТРУКТУРАХ ДНК

Как отмечалось в гл. 1, первичные и последующие фотохимические реакции после УФ-возбуждения могут происходить очень быстро. Например, показано, что димеры циклобутан-пиримидина (CPD) образуются за время ~ 1 пс после УФ-возбуждения [90, 213], что означает отсутствие изменения конформации стэкинга оснований. Ответы на вопросы из каких возбужденных состояний начинаются фотохимические реакции, и какова природа путей фотохимических реакций, имеют жизненно важное значение для понимания фундаментальных принципов фотохимии ДНК. Эти первичные фотопроцессы происходят на фемтосекундной временной шкале и сильно влияют на последующую фотохимию. В течение последнего десятилетия они представляли большой интерес для исследований [13, 224, 225]. Кроме того, свойства ДНК в возбужденном состоянии представляют интерес для использования переноса заряда по ДНК, имеющего отношение как к клеточным процессам, так и к устройствам на основе ДНК [226, 227].

4.1. Стационарная люминесценция и кинетика люминесценции различных форм цитозиновых цепочек ДНК.

В предыдущей главе мы рассматривали как меняется поглощение в олигонуклеотиде $(dC)_{10}$ в зависимости от конформации ДНК. В данной главе, используя свербыструю спектроскопию флюоресцентной ап-конверсии, изучается динамика возбужденного состояния в цитозиновых цепочках ДНК. В частности, мы изучили динамику возбужденного состояния как для нейтральных, так и для полупротонированных цепей цитозина $(dC)_{10}$, которые образуют так называемую структуру i-мотива. Структура i-мотива представляет интерес для биологии [228], а также для применения в нанотехнологиях [229]. Также известно, что прямое возбуждение цитозинов приводит к образованию мутагенных фотопродуктов, которые неэффективно восстанавливаются в клетках [230, 231], поэтому изучение

фотопроцессов в цитозинах важны для установления корреляции между исходной конформацией, природой возбужденного состояния и фотоповреждением. Мы обнаружили, что полупротонированная структура i-мотива $(dC)_{10}$ имеет две спектрально разные компоненты из-за локальных (мономероподобных) и делокализованных (экситонных) излучающих состояний [58].

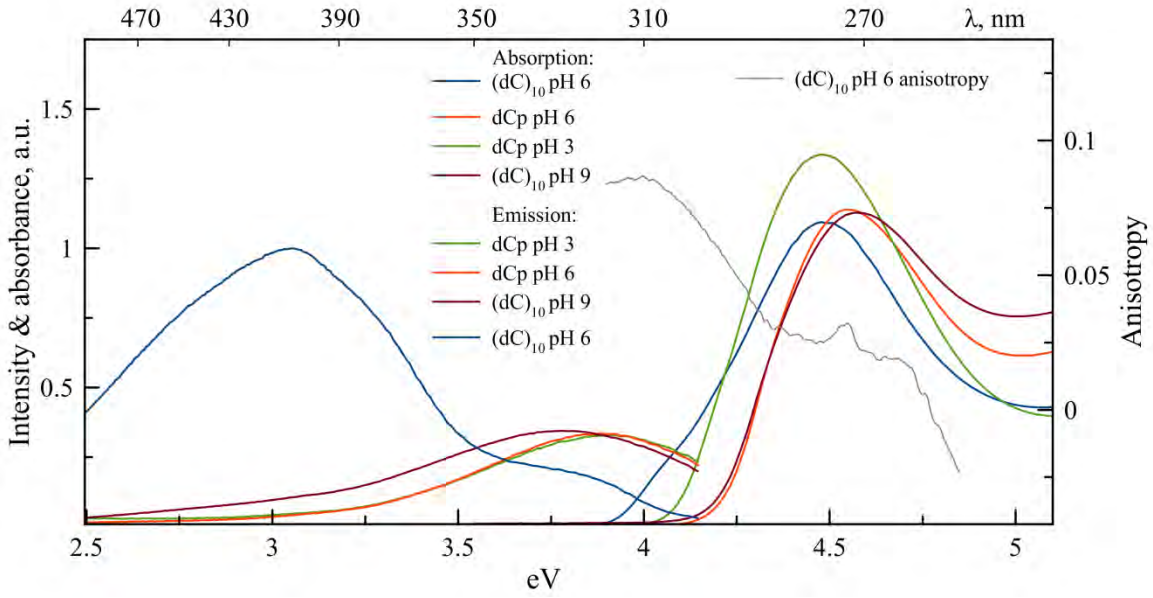


Рис. 4.1.1. Спектры поглощения, флуоресценции (λ_{ex} = 260 nm), и анизотропии возбуждения флуоресценции (λ_{em} = 400 nm) spectra of dCp и $(dC)_{10}$ при различных значениях pH [58].

Форма i-мотива (i-$(dC)_{10}$) образуется в растворе при pH 6 (см. гл. 3). Спектр стационарной флуоресценции i-$(dC)_{10}$ по сравнению с мономерными формами и ss-$(dC)_{10}$ демонстрирует широкую длинноволновую полосу излучения около 400 нм, в дополнение к мономерной полосе излучения 330 нм (рис. 4.1.1). Кинетика люминесценции мономера и двух форм ДНК была подробно исследована на фемтосекундной временной шкале.

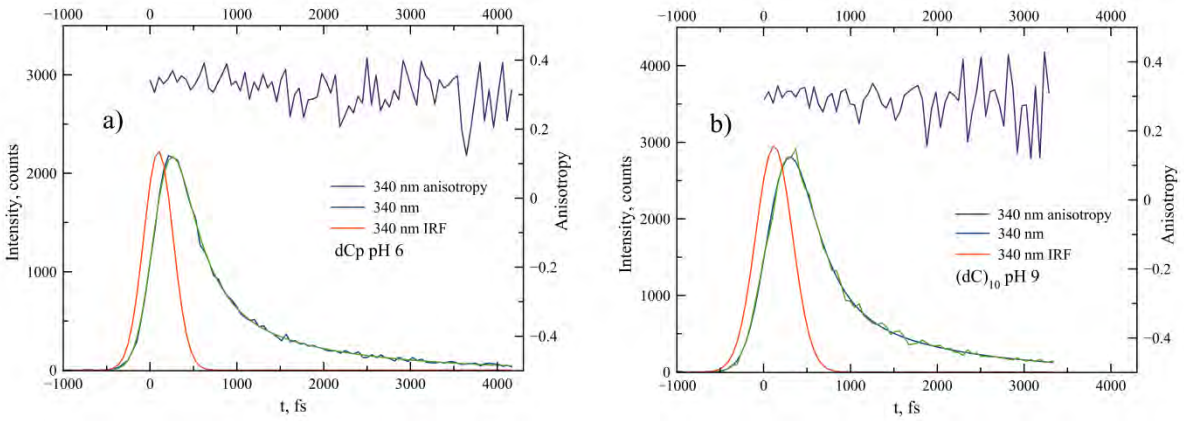


Рис. 4.1.2. Кривые интенсивности флуоресценции и затухания анизотропии флуоресценции dCp в воде (pH 6) (a) и $(dC)_{10}$ при pH 9 (b) [58].

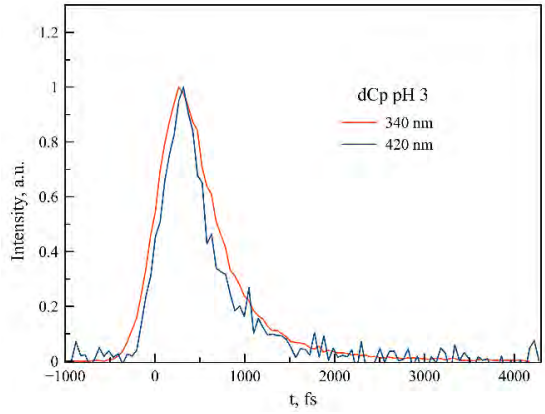


Рис. 4.1.3. Кривые затухания флуоресценции для dCp при pH 3 [58].

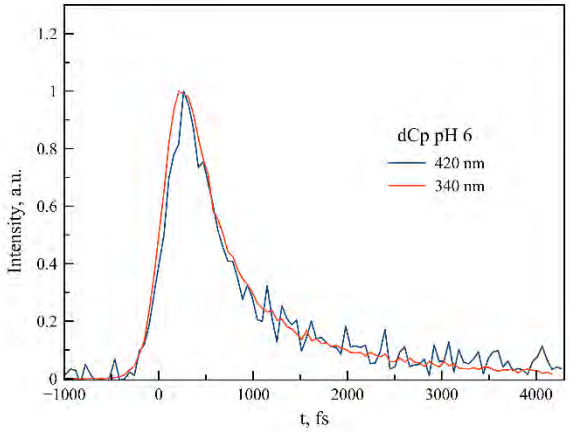


Рис. 4.1.4. Кривые затухания флуоресценции для dCp при pH 6 [58].

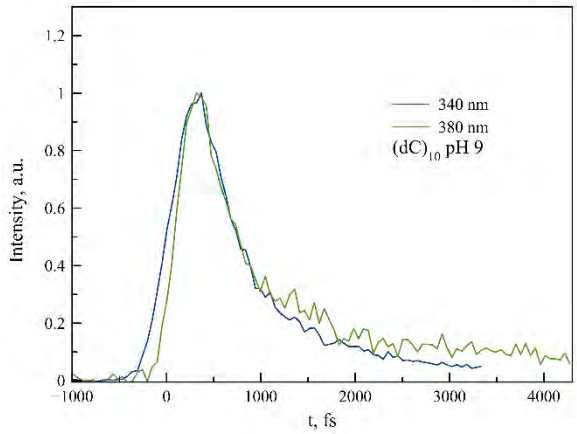


Рис. 4.1.5. Кривые затухания флуоресценции для $(dC)_{10}$ при pH 9 [58].

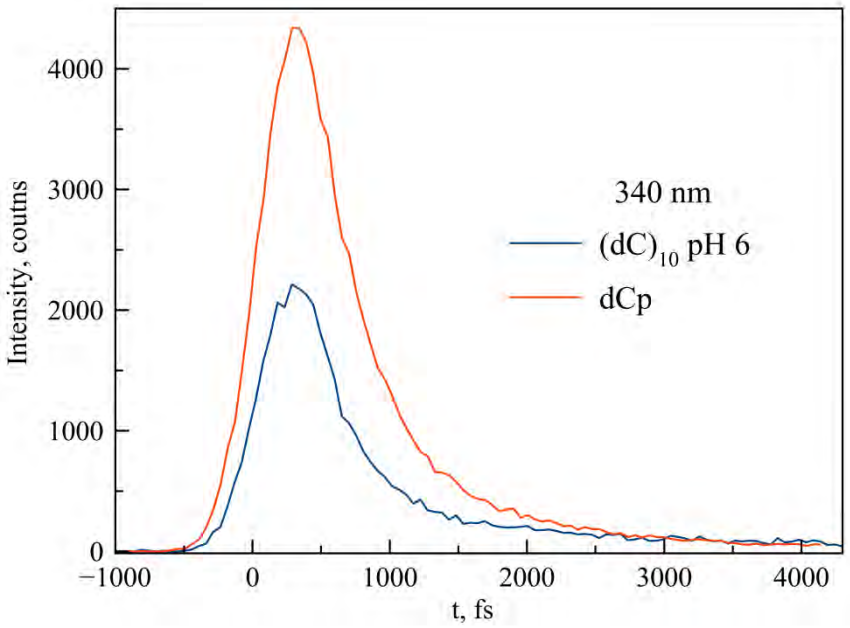


Рис. 4.1.6. Сравнение кривых затухания интенсивности флуоресценции на 340 нм для $(dC)_{10}$ в воде (pH 6) и полупротонированного dCp (усредненная суммарная кривая для нейтральной и протонированной форм). Сигналы регистрировались один за одним в растворах, имеющих одинаковое поглощение на длине волны возбуждения [58].

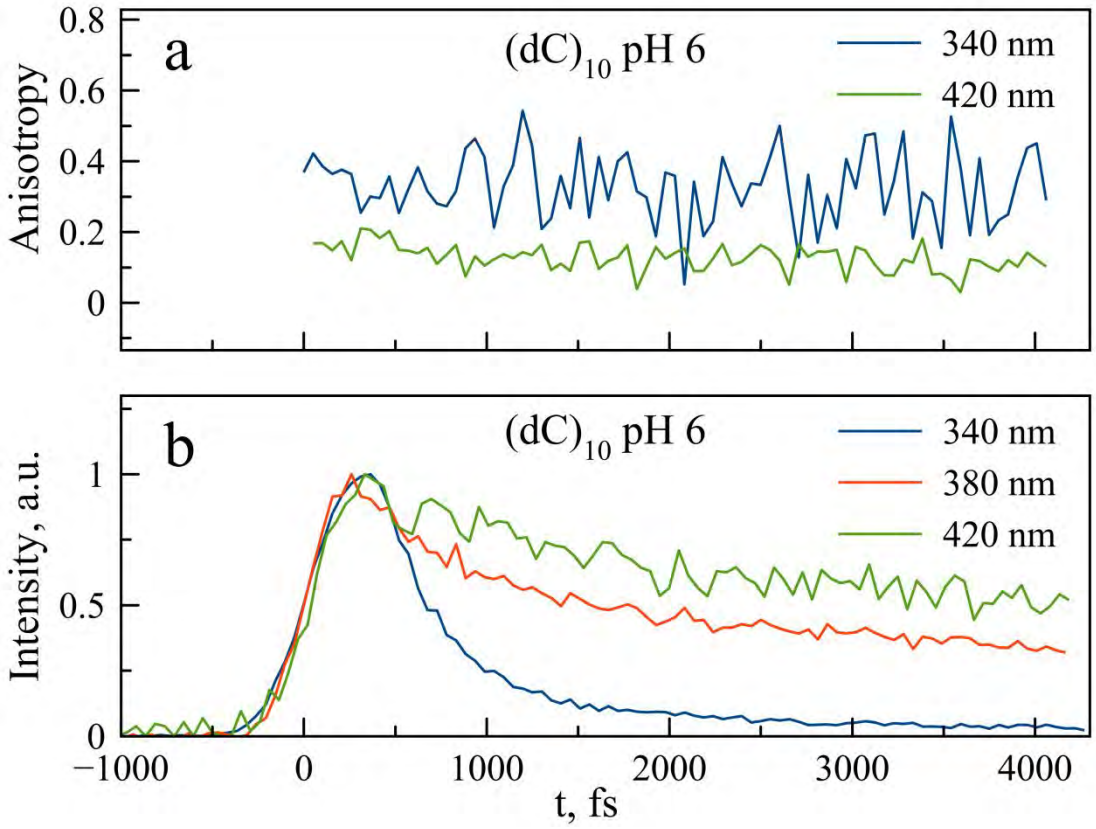


Рис. 4.1.7. Кинетика анизотропии (а) и интенсивности (б) флуоресценции $(dC)_{10}$ в воде (pH 6) при различных длинах волн регистрации [58].

Кривые флуоресценции и затухания анизотропии dCp при нейтральном и кислотном pH, ss-$(dC)_{10}$ при pH 9 и полупротонированного i-$(dC)_{10}$ при pH 6 (рис. 4.1.2-4.1.7), записанные при 340 нм практически одинаковы. Результаты аппроксимации приведены в таблице 4.1.1. Это означает, что природа коротковолновой полосы при 330 нм в спектрах полимера и мономера одинакова. Таким образом, это излучение в случае полимера можно рассматривать как «мономерную» флуоресценцию из локально возбужденного состояния. Однако амплитуда кривой затухания i-$(dC)_{10}$, оказывается, в 2 раза меньше, чем для мономера (рис. 4.1.6). Это указывает на то, что выход «мономерной» флуоресценции в i-$(dC)_{10}$ составляет около 50%. Это нельзя отнести к гипохромному эффекту, так как интегральное поглощение полупротонированного $(dC)_{10}$ только. на 5% меньше усредненного поглощения протонированного и

нейтрального мономера (рис. 4.1.1). Также следует отметить, что часть флуоресценции на длине волны 340 нм может относиться к одноцепочечной форме, присутствующей в растворе в этих экспериментальных условиях [221]. Возникает вопрос, куда уходит остальная часть возбуждения в i-$(dC)_{10}$?

Таблица 4.1.1. Компоненты затухания флуоресценции $(dC)_{10}$ и dCp для разных pH. Экспериментальные данные были аппроксимированы би-экспоненциальными функциями $a_1 exp(-t/t_1)+(1-a_1)exp(-t/t_2)$. В случае глобальной аппроксимации на длинной временной шкале использовалась три-экспоненциальная функция [58].

образец	a_1	t_1, фс	t_2, фс	t_3, фс
dCp, λ=340 нм, pH 6	0.79±0.03	310 ± 30	1400 ± 100	-
dCp, λ=340 нм, pH 3	0.83±0.07	310 ± 30	800 ± 100	-
$(dC)_{10}$, λ=340 нм, pH 9	0.80±0.03	300 ± 30	1400 ± 200	-
$(dC)_{10}$, pH 6 (глобальная аппроксим.)		310 ± 30	2000 ± 200	25000 ± 5000

Мы записали кривые затухания флуоресценции образцов dCp и $(dC)_{10}$ в диапазоне 310-450 нм. Для dCp и ss- $(dC)_{10}$ кривые затухания практически не зависят от длины волны (рис. 4.1.3-4.1.5). Кривые затухания для i-$(dC)_{10}$, записанные при длинах волн 340, 380 и 420 нм, представлены на рис. 4.1.7. В длинноволновой части спектра на кривых затухания наблюдаются медленные компоненты, которые становятся доминирующими при 380 нм (рис. 4.1.7). Кинетика i-$(dC)_{10}$ в диапазоне 310-450 нм может быть удовлетворительно аппроксимирована тремя экспонентами.

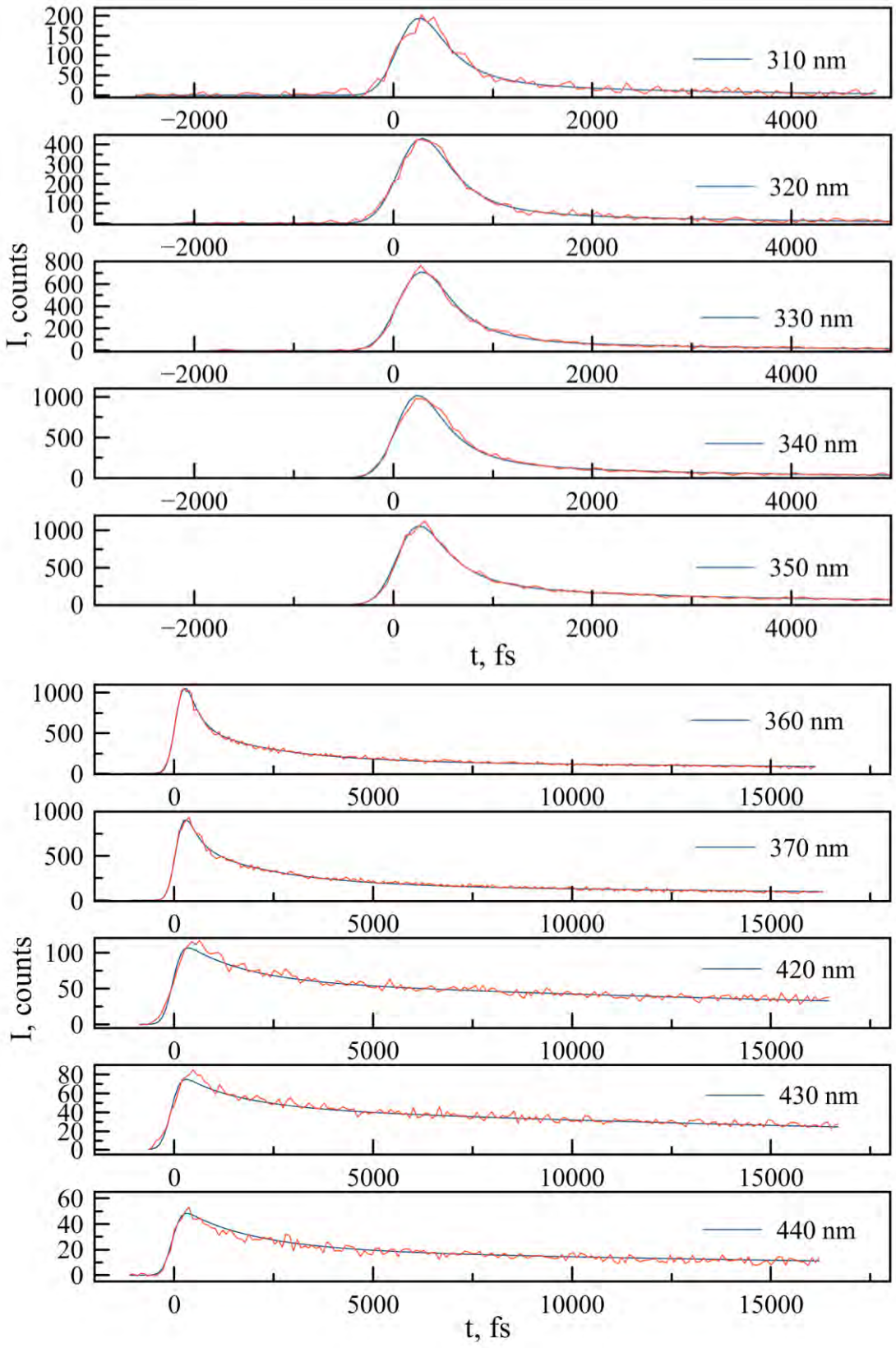


Рис. 4.1.8. Кривые затухания флуоресценции и результаты аппроксимации для $(dC)_{10}$ в воде (pH 6) на разных длинах волн [58].

Глобальное разложение дает времена затухания 310 фс, 2 пс и 25 пс. Спектры компонент показаны на рис. 4.1.8. Кривые затухания в диапазане 310 – 440 нм приведены на рис. 4.1.9.

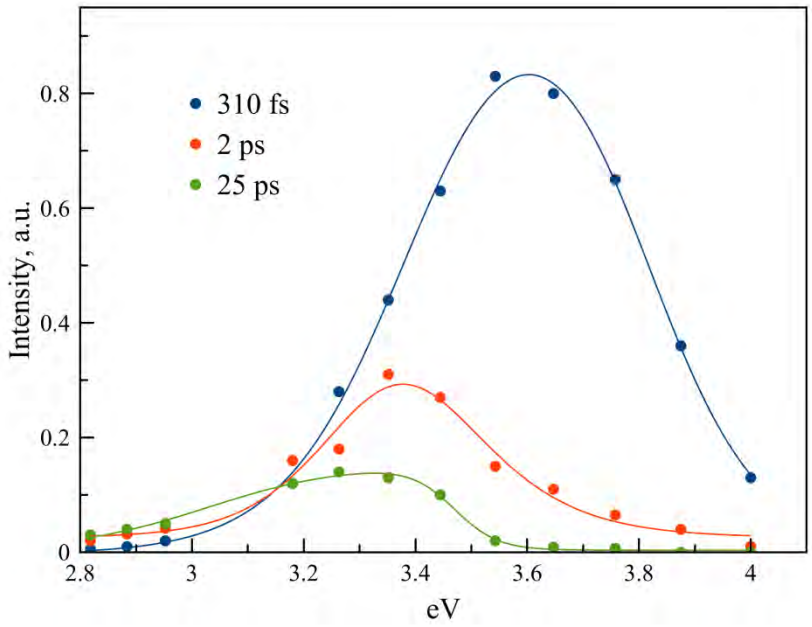


Рис. 4.1.9. Спектры затухания медленных и быстрых компонент i-$(dC)_{10}$ [58].

Коротковолновая компонента с временем затухания 310 фс, очевидно, может быть отнесена к люминесценции мономера, которая имеет аналогичное время затухания и анизотропию флуоресценции (хотя коротковолновый максимум в спектре немного смещен в красную сторону, что объясняется резким уменьшением чувствительности установки в коротковолновой области спектра). Компонента с временем затухания 2 пс (рис. 4.1.9) расположена в длинноволновой части спектра с максимумом около 370 нм. Другая долгоживущая компонента еще больше смещена в красную сторону. Анизотропия флуоресценции длинноволновых медленных компонент значительно меньше анизотропии флуоресценции на длине волны 340 нм (рис. 4.1.7), что указывает на их различные излучательные дипольные моменты.

Сдвинутые в красную сторону полосы флуоресценции в ДНК обычно относят к так называемой эксимерной флуоресценции компонентов ДНК [11, 232, 74]. Высокий квантовый выход образования долгоживущих эксимеров в

полупротонированных цепочках цитозина в конформации i-мотива наблюдался в измерениях переходного поглощения («накачка-зонд») [233-235], но их времена жизни были намного больше (сотни пс). Следует отметить, что термин «эксимер» (возбужденный димер) подразумевает две молекулы одного и того же типа, одну в электронно-возбужденном состоянии, а другую в основном состоянии, которые, при уменьшении расстояния, образуют эксимер. в результате взаимного притяжения [236]. Теоретические расчеты [75, 237] в согласии с экспериментальными наблюдениями [72, 73] действительно предсказывают образование таких состояний, например, в нитях аденина с конформацией оснований «лицом к лицу». Образование эксимеров в случае цитозинов в стэкинге также предсказывается теорией [238] и наблюдается экспериментально [233-235, 239]. Аналогичная полоса флуоресценции, смещенная в красную сторону на 360 нм, наблюдаемая для полиаденинов, была отнесена к эксимерам [74, 75]. Есть два фактора, которые противоречат отнесению эмиссии 370 нм в i- (dC) 10 к эксимеру. Во-первых, время нарастания флуоресценции в диапазоне 370-450 нм быстрее временного разрешения прибора, то есть менее 100 фс (рис. 4.1.7-4.1.8). Кроме того, значительное уменьшение сигнала для i-$(dC)_{10}$ при 340 нм по сравнению с сигналом dCp (рис. 4.1.6) предполагает, что излучающее состояние 370 нм формируется очень быстро, непосредственно из состояния Франка-Кондона, а не из локально возбужденного мономера. Временной интервал менее 100 фс слишком мал для любого взаимного сближения оснований. Во-вторых, Стоксов сдвиг мономера, а также спектральный сдвиг между низко-энергетическим переходом ~ 4.1 эВ в спектре поглощения i-$(dC)_{10}$ (рис. 4.1.1) и спектральным максимумом медленной компоненты в спектре (рис. 4.1.9) имеют одинаковое значение, ок. 0,8 эВ. Таким образом, излучение с длиной волны 370 нм происходит непосредственно из состояния с наименьшей энергией в стэкинг-структуре полупротонированного $(dC)_{10}$ без какой-либо структурной перестройки оснований. Анализ разностных плотностей (таблица 3.6.2) указывал, что как экситонные, так и взаимодействия с переносом заряда (CT) и зарядово-резонансные (CR) взаимодействия вносят вклад в самое низкое S1-состояние i-

мотива. Фактически это означает, что излучающее состояние 370 нм является делокализованным состоянием.

Поскольку время жизни флуоресценции локального возбужденного состояния не изменяется в $(dC)_{10}$, разумно предположить, что последующий перенос заряда в флуоресцентном состоянии, вероятно, приводит к образованию долгоживущих эксимеров, наблюдаемых в масштабе субнаносекундного времени. Например, в случае цепочек аденина недавно было высказано предположение, что состояния переноса заряда образуются в течение 3 пс [240]. Предлагаемая схема фотопроцессов в структуре i-$(dC)_{10}$ показана на рис. 4.1.10.

Возникает вопрос, почему делокализованное экситонное состояние имеет относительно длительное время жизни в несколько пикосекунд, что не наблюдается в других структурах ДНК. Два фактора в структуре i-$(dC)_{10}$ могут быть ответственны за этот эффект: большое значение экситоного расщепления, сравнимое с шириной полосы поглощения и / или вклад члена CT / CR в экситонное состояние с самой низкой энергией. Более подробное описание структуры и динамики возбужденных состояний в i-мотиве требует дальнейших теоретических и экспериментальных исследований.

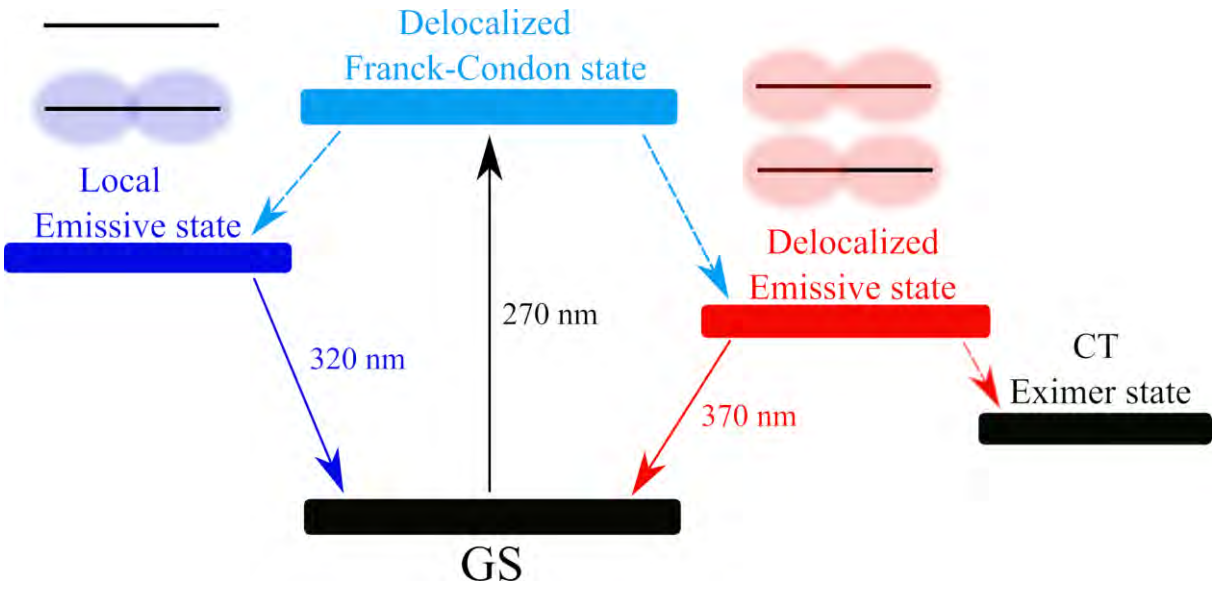


Рис. 4.1.10. Фотопроцессы в i-$(dC)_{10}$ [58].

4.2. Кинетика люминесценции высокомолекулярной ДНК.

Для тимусной высокомолекулярной ДНК (CT DNA) максимум спектра флуоресценции при возбуждении в максимуме полосы поглощения (260 нм), как и для большинства полимерных форм НК, близок к максимуму флуоресценции мономеров около 330 нм (рис. 4.2.1). Время жизни флуоресценции основной компоненты составляет около 300 фс (рис. 4.2.2). Столь короткое время жизни обуславливает весьма низкий квантовый выход (10^{-4}) флуоресценции. Аналогичное время жизни было зарегистрировано в работе [31].

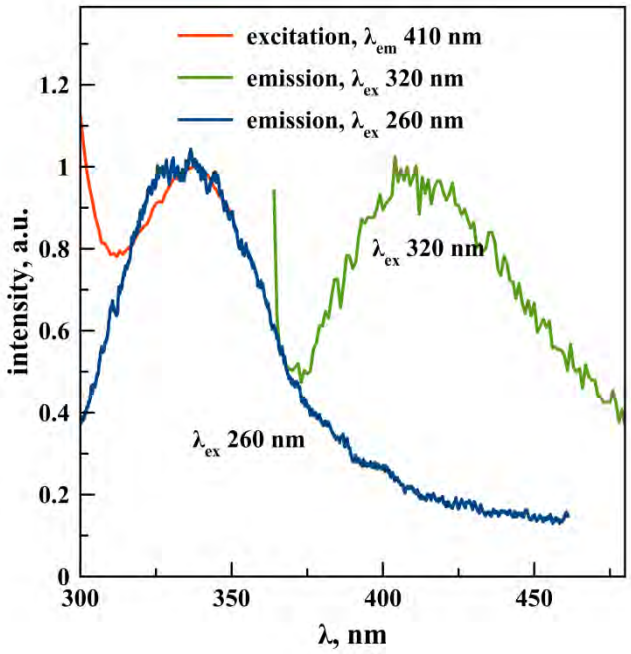


Рис. 4.2.1. Нормированные спектры флуоресценции CT ДНК при возбуждении на 260 нм и 320 нм; спектр возбуждения, λ_p 410 нм.

Увеличение концентрации ДНК до 10^{-3} М позволило зарегистрировать спектр флуоресценции при возбуждении на длинноволновом краю поглощения. При этом, максимум флуоресценции находится около 420 нм, а спектре возбуждения наблюдается полоса на 320 нм, что совпадает с максимумами в спектрах поли-А и агрегатов АМФ [96, 98]. Данное наблюдение позволяет сделать вывод, что и в природной ДНК наблюдаются низко-лежащие ЭВС, аналогично состояниям,

наблюдавшимся для модельных систем НК. Данные состояния, очевидно, редки, и в спектре поглощения их не видно из-за достаточно малой концентрации и коэффициента поглощения. Однако, они в случае стэкинга адениновых оснований и в случае природной ДНК обладают относительно большим квантовым выходом эмиссии, что подтверждается их относительно высокими временами жизни флуоресценции. Так кривая затухания флуоресценции ДНК при возбуждении 340 нм (рис. 4.2.3) помимо основной быстрой компоненты, лежащей за пределами разрещающей способности установки (~0.1 нс), обнаруживает компоненты с временами затухания 1.4 и 5.7 нс, составляющими основную часть интегральной интенсивности, наблюдаемой в стационарном спектре.

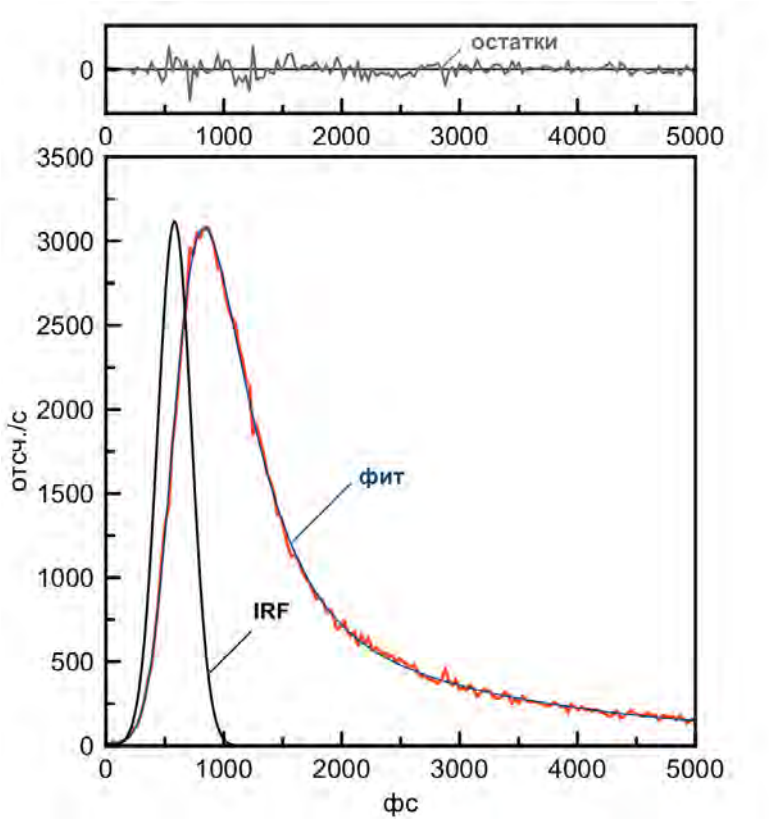


Рис. 4.2.2. Кривая затухания флуоресценции ДНК, полученная методом ап-конверсии в фемтосекундном диапазоне ($\lambda_в$ = 267 нм).

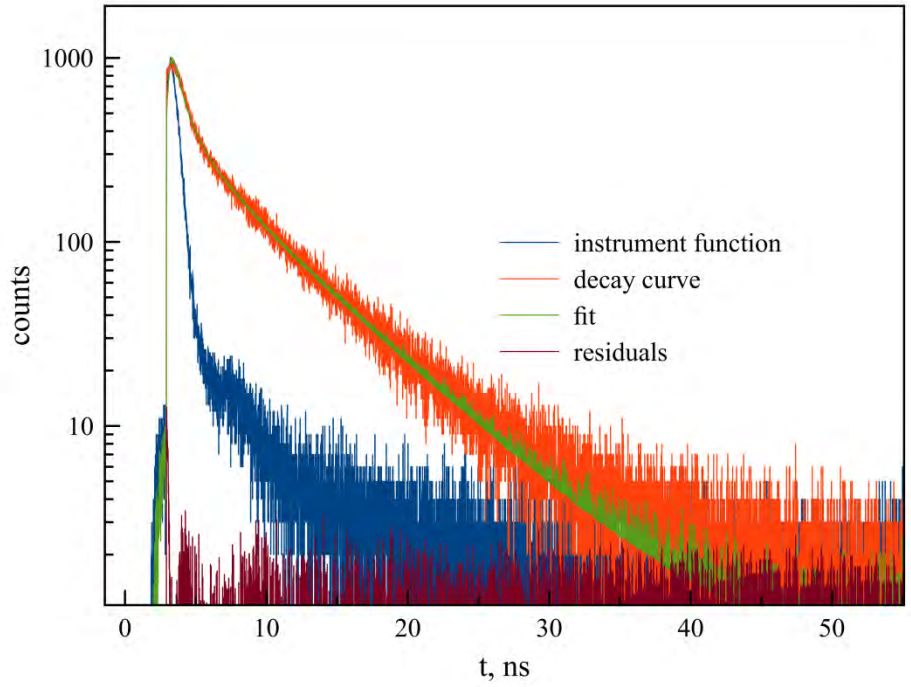


Рис. 4.2.3. Кривая затухания флуоресценции раствора 10^{-3} М ДНК при возбуждении 340 нм и регистрации 410 нм. Аппроксимация: 4.4exp(-t/12 ps) + 0.0038exp(-t/1.4 ns) + 0.0024exp(-t/5.7 ns).

4.3. Перенос энергии в ДНК.

Технические трудности в УФ-диапазоне и неоднородность изучаемых систем затрудняют исследование динамики экситонов в ДНК. В качестве альтернативного подхода эксперименты по передаче энергии с использованием оснований в качестве доноров и молекул, связанных с ДНК в качестве акцепторов, могут быть использованы для непосредственного измерения расстояния и эффективности миграции энергии возбуждения и длины экситона в ДНК. Поскольку время жизни флуоресценции ДНК обычно составляет сотни фемтосекунд [84], эффективная миграция энергии на большие расстояния могла бы обнаружить экситонный механизм переноса и делокализацию экситона на большие расстояния. Эксперименты с красителями, а также с модифицированными основаниями в качестве акцепторов энергии демонстрировали передачу энергии только от ближайших соседних оснований

[12, 112, 115, 116, 241]. Этот факт, кажется, подтверждает общее мнение [13], что экситонное взаимодействие ограничено взаимодействием ближайших оснований вдоль цепи. Очевидно, что дальние когерентные эффекты не играют основной роли в относительно низкоэффективном захвате энергии акцепторами, используемыми в этих системах. Мы также исследовали эффективность переноса энергии в двуспиральной форме тимусной природной ДНК, используя интеркалирующий краситель в качестве акцептора. Эффективность переноса энергии с оснований ДНК на акцептор оценивалась следующим образом. Как правило, интенсивность сигнала в видимой области спектра возбуждения (*I*, деленная на интенсивность возбуждения) определяется коэффициентом поглощения акцептора (ε_A) и коэффициентом, пропорциональным концентрации акцептора (*C*), длине пути (*l*), квантовому выходу флуоресценции (Φ), и инструментальному фактору (*k*):

$$I(\lambda) = \varepsilon_A(\lambda) 2.3 Cl\Phi k \qquad (4.3.1).$$

Если спектр возбуждения нормирован на единицу, он может быть выражен как:

$$I(\lambda) = \varepsilon_A(\lambda) / \varepsilon_A^{max} \qquad (4.3.2),$$

где ε_A^{max} обозначает коэффициент экстинкции акцептора в максимуме спектра поглощения в видимой области. *I(λ)* представляет собой безразмерную величину, нормированную на единицу в максимуме. В диапазоне поглощения ДНК добавляется дополнительный член, представляющий передачу возбуждения от ДНК к акцептору:

$$I(\lambda) = (\varepsilon_A(\lambda) + \varepsilon_{DNA}(\lambda) \cdot \varphi) 2.3 Cl\Phi k \qquad (4.3.3),$$

где ε_{DNA} обозначает коэффициент экстинкции ДНК и φ эффективность переноса возбуждения. Нормированный спектр возбуждения затем выражается как:

$$I(\lambda) = \varepsilon_A(\lambda)/\varepsilon_A^{max} + \varepsilon_{DNA}(\lambda)/\varepsilon_A^{max} \cdot \varphi \quad (4.3.4),$$

или в более простой форме:

$$I(\lambda) = A_A(\lambda) + A_{DNA}(\lambda) \cdot \varphi \quad (4.3.5),$$

где:

$$A_A(\lambda) = \varepsilon_A(\lambda)/\varepsilon_A^{max} \quad (4.3.6),$$

$$A_{DNA}(\lambda) = \varepsilon_{DNA}(\lambda)/\varepsilon_A^{max} \quad (4.3.7).$$

Поглощение комплекса (*A*) может быть аппроксимировано суммой собственного поглощения акцептора и поглощения ДНК:

$$A(\lambda) = A_A(\lambda) + A_{DNA}(\lambda) \quad (4.3.8).$$

При этом мы пренебрегаем взаимодействием основание-акцептор, которое может влиять на коэффициент экстинкции ДНК. Анологично *I(λ), A(λ)* также являются безразмерными величинами, нормированными на 1 в видимой области. Если для комплекса ДНК с акцептором известен спектр поглощения комплекса, тогда, из уравнений 4.3.5 и 4.3.8, эффективность переноса может быть получена как:

$$\varphi = 1 - \frac{A(\lambda) - I(\lambda)}{A_{DNA}(\lambda)} \quad (4.3.9).$$

В этом уравнении спектры поглощения *A(λ)* и возбуждения флуоресценции *I(λ)* комплекса акцептор – ДНК нормированы на единицу в видимой области. Спектр поглощения ДНК $A_{DNA}(\lambda)$ масштабируется с использованием уравнения 4.3.7. В случае, когда поглощение акцептора в области 260 нм можно вычесть из спектра

поглощения комплекса, или в случае, когда $A_A(\lambda) \ll A_{DNA}(\lambda)\cdot\varphi$ в максимуме поглощения ДНК, уравнение 4.3.5 можно записать как:

$$I(260) \cong \boldsymbol{A_{DNA}}\ (260)\cdot\varphi \qquad (4.3.10).$$

Используя уравнение 4.3.7 и усредненный молярный коэффициент экстинкции оснований ДНК ($\boldsymbol{\varepsilon_{DNA\ b.}}$), уравнение 4.3.10 можно записать в виде:

$$I(260) \cong \varepsilon_{DNA\ b.}(260)\cdot N/\varepsilon_A^{max}\ \cdot\varphi \qquad (4.3.11),$$

где N - количество мономеров ДНК, передающих энергию акцептору. Если более чем один акцептор вносит вклад в излучение, возбуждаемое при 260 нм, то левая часть уравнения берется с коэффициентом f, долей данного акцептора на длине волны излучения:

$$I(260)\cdot f = \varepsilon_{DNA\ b.}(260)\cdot N/\varepsilon_A^{max}\ \cdot\varphi \qquad (4.3.12).$$

Тогда число оснований, передающих энергию возбуждения акцептору, можно оценить по спектру возбуждения флуоресценции следующим образом:

$$\boldsymbol{N = \frac{I(260)\cdot f\cdot \varepsilon_A^{max}}{\varepsilon_{DNA\ b.}(260)\cdot\varphi}} \qquad (4.3.13).$$

На рис. 4.3.1 показаны спектры флуоресцентного излучения и возбуждения комплекса ДНК с акридиновым оранжевым (АО-ДНК) и спектр поглощения АО в комплексе, полученный как дифференциальный спектр АО-ДНК/ДНК. При используемом соотношении АО/ДНК (0,01) АО связывается с ДНК путем интеркаляции [242-244]. Комплекс АО-ДНК демонстрирует типичный спектральный сдвиг максимумов возбуждения и излучения по сравнению с раствором АО (рис. 4.3.2). Спектр дифференциального поглощения комплекса

акридин-ДНК - чистая ДНК позволяет оценить вес красителя в УФ-диапазоне спектра возбуждения комплекса.

Для оценки числа оснований, передающих энергию красителю, мы использовали уравнение 4.3.13, где *I(260)* обозначает разницу между спектром возбуждения комплекса АО-ДНК и спектром поглощения АО, нормированным на 1, $f = 1$, и ε_A^{max} - коэффициент экстинкции для АО в видимом максимуме ($6 \cdot 10^4$ M^{-1} cm^{-1} [243, 244]). Из 4.3.13 мы получили $N = 4{,}3 \pm 0{,}5$ основания. Это значение означает, что перенос энергии в комплексе АО-ДНК происходит от четырех ближайших соседних оснований (находящихся в ван-дер-ваальсовом контакте с красителем) в двухцепочечной ДНК, что согласуется с другими исследованиями переноса энергии в аналогичных комплексах ДНК–акцептор [12].

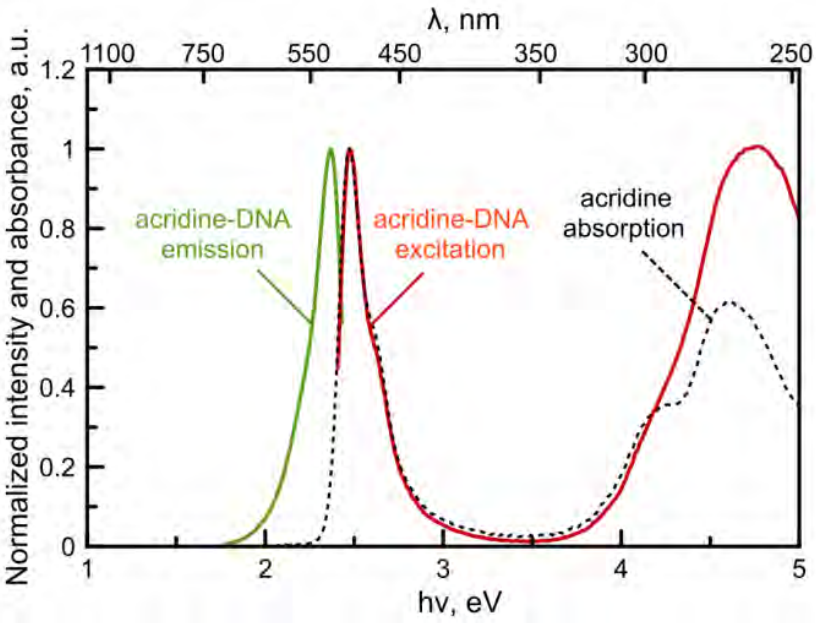


Рис. 4.3.1. Спектры флуоресцентного излучения (зеленый) и возбуждения (красный) комплекса АО – ДНК; пунктирная линия обозначает дифференциальный спектр АО-ДНК / ДНК [56].

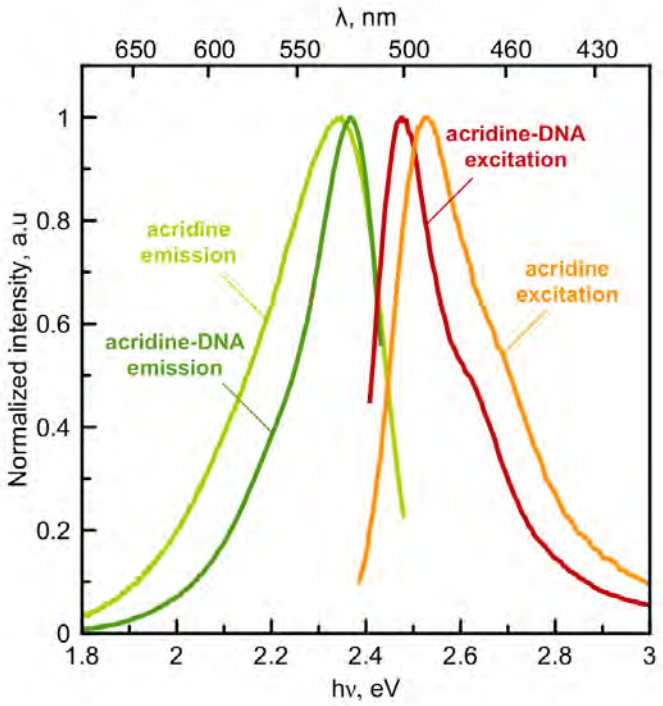


Рис. 4.3.2. Спектры возбуждения и эмиссии АО и АО – ДНК комплекса. $C_{DNA}=6\cdot10^{-5}$ М, $C_{AO}=6\cdot10^{-7}$ М (соотношение АО: фосфат ДНК = 1: 100) [56].

4.4. Выводы к главе 4.

Динамика возбужденного состояния на фемтосекундной временной шкале для двух конформаций олигонуклеотида $(dC)_{10}$ существенно различается. Для односпиральной формы ДНК время затухания флуоресценции такое же как и для мономера (около 300 фс), что указывает на локализацию возбуждения на мономере и последующую флуоресценцию из мономерного возбужденного состояния. Для формы i-мотива за время <100 фс происходит релаксация в нижнее экситонное (делокализованное) состояние, время жизни которого составляет около 2 пс, что не наблюдалось ранее для других форм ДНК. В дальнейшем, экситонное состояние, вероятно переходит в эксиплексное состояние с переносом заряда.

Для нативной двуспиральной формы тимусной ДНК обнаружено два типа люминесцентных состояний: коротковолновое, быстро затухающее с временем жизни около 300 фс, и длинноволновое, возбуждаемое на длинноволновом краю

спектра поглощения, затухающее в наносекундном диапазоне. Различные типы излучений, вероятно, относятся к разным конформациям стэкинга оснований в ДНК. Длинноволновая люминесценция, вероятно, принадлежит малой доле оснований с формой стэкинга, характеризующейся низкоэнергетическими переходами и способной наиболее эффективно поглощать солнечную радиацию.

В комплексе СТ ДНК с интеркалирующим красителем АО перенос энергии возбуждения на молекулу красителя происходит только с 4-х ближайших оснований, находящихся в непосредственном контакте с красителем. Данный результат может указывать на невысокую степень делокализации возбуждения для большинства сайтов в СТ ДНК.

ГЛАВА 5. СТРУКТУРА КОМПЛЕКСОВ ДНК С КЛАСТЕРАМИ СЕРЕБРА. ЭЛЕКТРОННО-ВОЗБУЖДЕННЫЕ СОСТОЯНИЯ КОМПЛЕКСОВ

В работе [117] было показано, что люминесцирующие кластеры серебра, связанные с ДНК, могут выступать в качестве эффективных акцепторов электронного возбуждения. Кластеры серебра, таким образом, могут быть использованы для оценки радиуса миграции энергии в ДНК. Однако, структура комплексов кластеров с ДНК, а также природа электронных состояний комплексов оставались неизвестными. В данной части диссертационной работы решалась задача определения структуры комплексов и определения их фотофизических характеристик.

5.1. Структуры свободных кластеров серебра и их электронные спектры возбуждения.

Для верификации выбранного нами метода рассчета спектров кластеров серебра (Ag), мы сравнили полученные результаты с экспериментальными спектрами поглощения кластеров, полученных в матрицах инертных газов. Оптимизация геометрии кластеров серебра для Ag_0^n и $Ag_+Ag_0^{(n-1)}$ структур, где n = 1-6, выполнялась без каких-либо ограничений на симметрию. Конфигурации с наименьшей энергией были выбраны для расчета спектров поглощения. Как заряженные, так и нейтральные оптимизированные кластеры серебра, содержащие до 6 атомов обладают плоской симметрией, которая хорошо согласуется с предыдущими расчетами [138, 141, 245] (рис. 5.1.1).

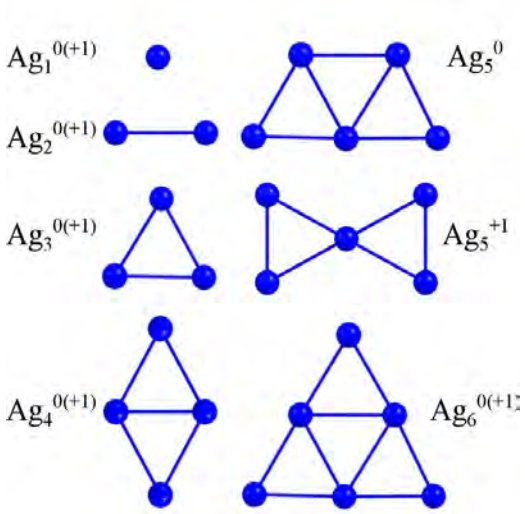


Рис. 5.1.1. Оптимизированные структуры заряженных и нейтральных кластеров серебра [45].

Дальнейшие расчеты оптических свойств были выполнены для оптимизированных структур методом TD DFT. Результаты расчетов для свободных планарных нейтральных и заряженных кластеров показывали хорошее согласие с литературными низкотемпературными спектрами поглощения [45].

Особенность экспериментальных спектров возбуждения люминесценции кластеров Ag, стабилизированных полимерами, заключается в том, что в видимом диапазоне наблюдается только один интенсивный переход, и вплоть до дальней УФ области интенсивных переходов не наблюдается [117, 149, 246]. Что касается кластеров на ДНК, все флуоресцентные комплексы имеют сильную самую низкоэнергетическую полосу, а также полосу поглощения ДНК на уровне около 5 эВ со слабыми переходами в промежутке [117, 149]. Соответственно, структуры флуоресцентных кластеров должны обладать этой особенностью в своем спектре возбуждения. Оказывается, что данная характерная особенность флуоресцирующих кластеров присуща кластерам нитевидной формы. Мы рассмотрели кластеры до 8 атомов, имеющих вытянутую форму, так что каждый атом связан только с одним или двумя соседями. Основное различие между плоскими и нитевидными кластерами заключается в их способности к самообразованию. Формирование вытянутых форм кластеров обязательно

предполагает связь с полимером в отличие от плоских форм. В такой модели спектры поглощения нитевидных кластеров определяют геометрические параметры, заданные полимерной цепочкой.

Мы построили различные цепочки до 8 атомов Ag с наложенными ограничениями на углы изгиба. Затем мы рассчитали спектры возбуждения для оптимизированных нитевидных кластеров с этими ограничениями. Спектры для строго линейных цепочек атомов серебра разного заряда показаны на рисунке 5.1.2. Спектры, рассчитанные для одномерных цепочек нейтральных и однозарядных кластеров хорошо согласуются с теми, что были получены ранее [142] аналогичным методом.

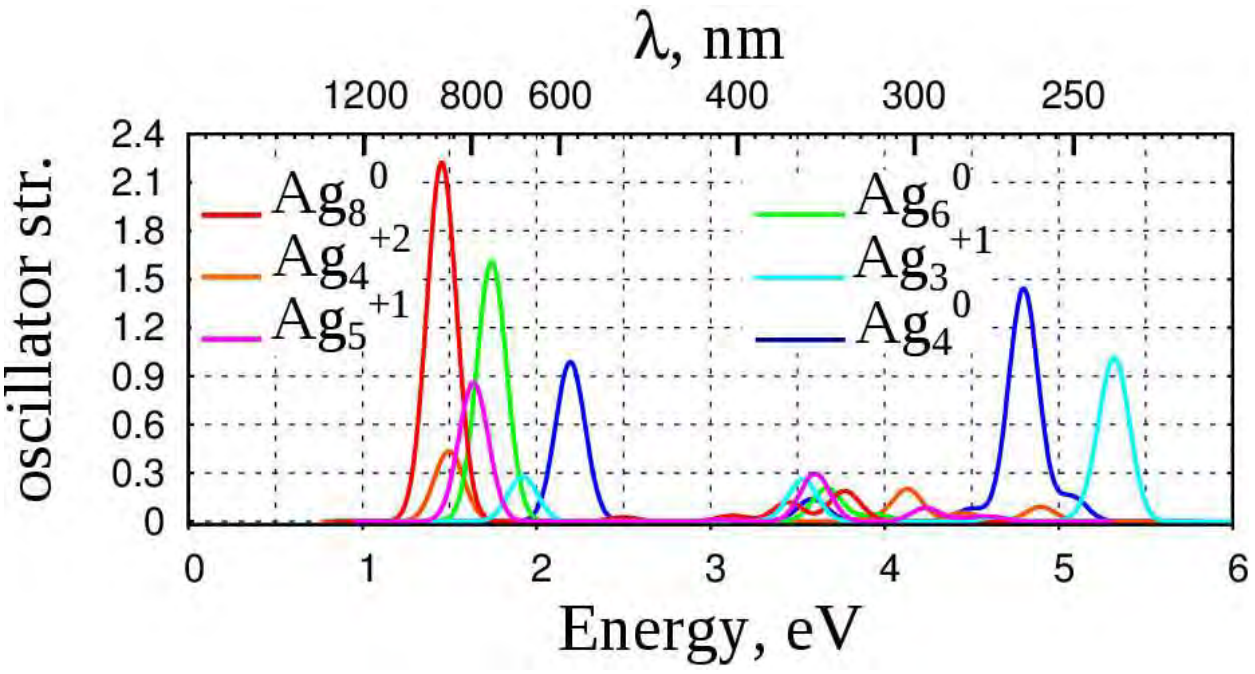


Рис. 5.1.2. Спектры возбуждения для нитевидных кластеров до 8 атомов Ag [45].

Далее нами были рассмотрены изогнутые нити атомов. Оказалось, что просто изменяя угол изгиба в цепочке атомов, можно получить низкоэнергетические пики, которые покрывают всю видимую область (~ 1,7-3 эВ) в спектрах возбуждения. (рис. 5.1.3).

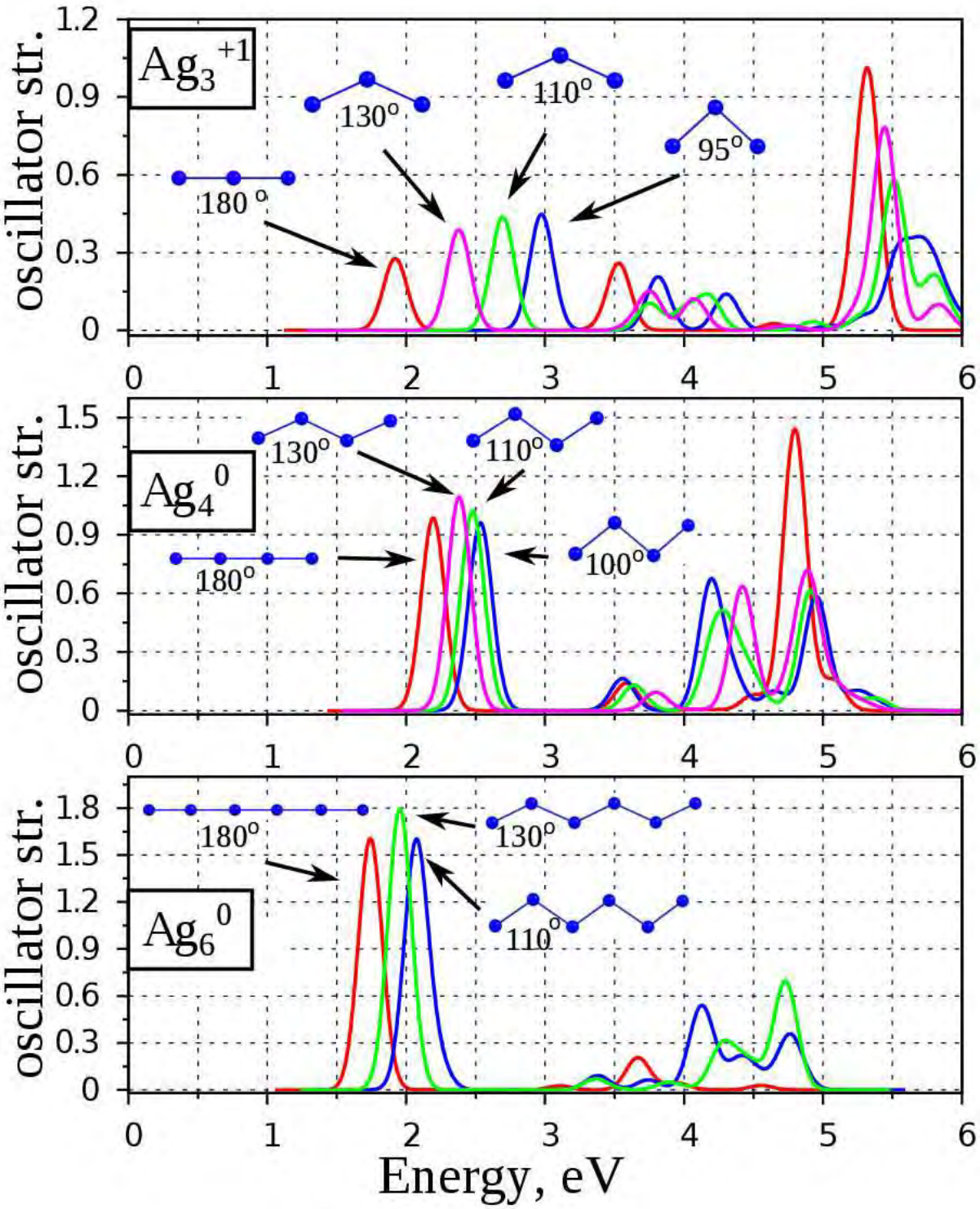


Рис. 5.1.3. Спектры возбуждения для нитевидного Ag_3^{+1}, Ag_4^0, Ag_6^0 кластеров с разным изгибом [45].

Форма спектров кластеров нитевидной формы, в отличие от планарных и сферических кластеров, соответствует форме спектров возбуждения кластеров, стабилизированных ДНК. При этом спектральные свойства кластеров

определяются зарядом, длиной и формой цепочки. Однако, возникает вопрос, каким образом такая форма кластеров может быть стабилизирована в растворе. Для решения этой задачи мы определили детальные структуры для ряда флуоресцирующих комплексов кластеров с олигонуклеотидами.

5.2. Структуры кластеров в комплексах с 12-мерной ДНК и их электронные спектры возбуждения.

В данном разделе мы описываем предложенную нами новую методологию получения структуры флуоресцентных комплексов Ag-ДНК. Мы синтезировали три разных типа кластеров Ag на одной и той же матрице ДНК, люминесцирующих от фиолетового до красного спектрального диапазона. Варьирование нуклеотидной последовательности и условий pH позволило нам идентифицировать сайты расположения кластеров. Стабильные структуры флуоресцентных комплексов Ag-ДНК были получены с помощью QM/MM моделирования. Получено разумное согласие между экспериментальными спектрами флуоресцентного возбуждения и анизотропии возбуждения и соответствующими расчетными спектрами, что подтверждает достоверность найденных структур. Результаты наших расчетов показывают, что: 1) заряженные кластеры Ag_3^{+1} и Ag_4^{+2} образуют хромофорное ядро комплекса Ag-ДНК, способное излучать в широком спектральном диапазоне; 2) на спектральные свойства кластеров сильно влияет матрица ДНК.

12-мерная последовательность ДНК 5'-CCTCCTTCCTCC-3 '(ДНК 1), а также аналогичные последовательности палиндрома 5'-CCACCTTCCACC-3' (ДНК 2) и 5'-CCTCCAACCTCC-3 '(ДНК 3) с заменой тиминов аденинами были использованы в качестве матриц для синтеза кластеров Ag. Последовательность ДНК 1 использовалась ранее для синтеза красных излучающих кластеров [247]. В этой работе мы оптимизировали экспериментальные условия, чтобы кластеры излучали также на более коротких длинах волн. Таким образом, ожидаемый меньший размер кластера облегчал QM расчеты.

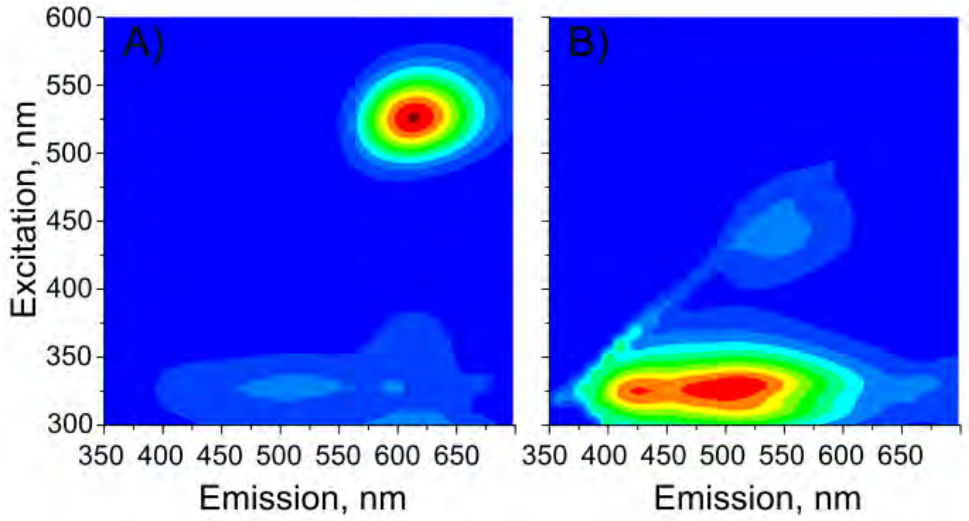


Рис. 5.2.1. 2D контурные графики флуоресценции кластерных комплексов ДНК 1 - Ag, полученные через час (A) и два месяца (B) после синтеза [51].

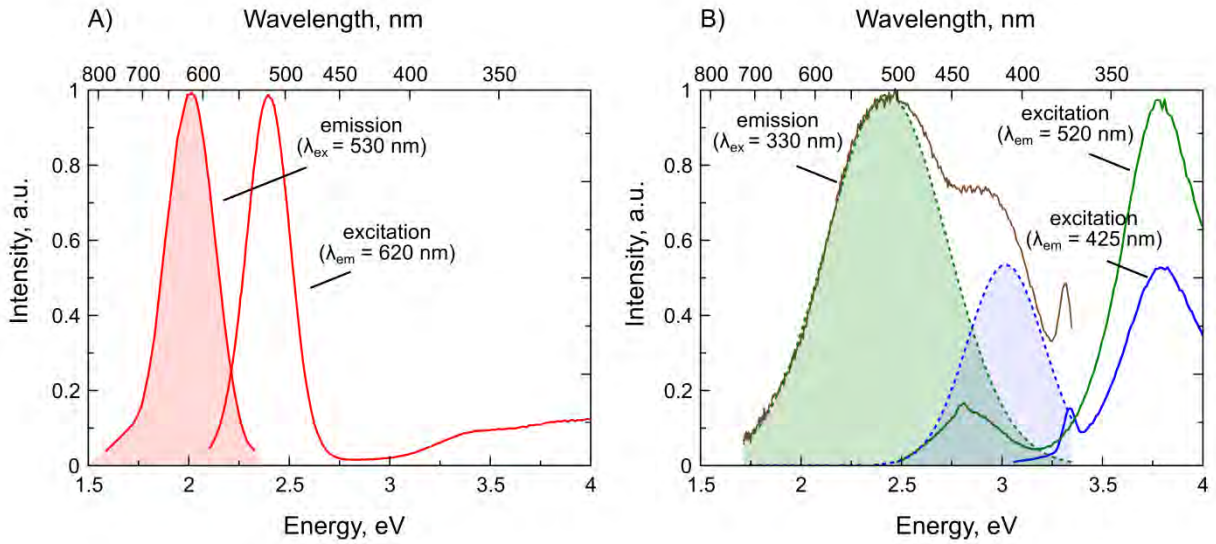


Рис. 5.2.2. Спектры флуоресценции и ее возбуждения для трех различных кластеров Ag на ДНК 1. (А) - красный кластер через час после синтеза. (Б) - зеленые и фиолетовые кластеры через два месяца после синтеза; спектр флуоресценции аппроксимирован двумя гауссианами [51].

В первые часы после синтеза кластера на ДНК-1 появляется сильная полоса излучения на 620 нм, а также более слабая полоса на 510 нм (рис. 5.2.1А). Во время последующего старения раствора полоса излучения 620 нм исчезает, а

новая полоса растет на 410 нм (рис. 5.2.1B). Наблюдаемые три полосы флуоресцентного излучения в фиолетовом, зеленом и красном спектральных диапазонах, очевидно, соответствуют смеси трех флуоресцентных комплексов, имеющих различную структуру. Красный кластер (620 нм), стабильный при кислотном pH, имеет самый низкий переход возбуждения на 530 нм (рис. 5.2.2A). Полоса излучения кластера с зеленой эмиссией на 510 нм имеет максимум возбуждения с самой низкой энергией на 440 нм, в то время как у кластера, излучающего на 410 нм, наблюдается переход в спектре возбуждения с самой низкой энергией на 330 нм (рис. 5.2.2B). Флуоресцентный кластер серебра стабилизированный ДНК с максимумами возбуждения / испускания при 330/410 нм был получен впервые.

Алгоритм нахождения структуры флуоресцентных комплексов был следующим. На первом этапе мы определили структуру комплекса ДНК с ионами - ДНК-Ag^{+} - прекурсора кластера. Затем модификации последовательности ДНК, не влияющие на вторичную структуру комплекса ДНК с кластерами ДНК-Ag, позволили нам определить вероятные сайты связывания кластеров. На следующем этапе были получены QM/MM оптимизированные структуры комплексов. Количество атомов серебра и их заряд варьировались так, чтобы рассчитанные электронные спектры возбуждения и спектры поляризации возбуждения комплексов соответствовали экспериментальным спектрам. Согласие между расчетным и экспериментальным спектрами подтвердило достоверность полученных структур флуоресцентных комплексов.

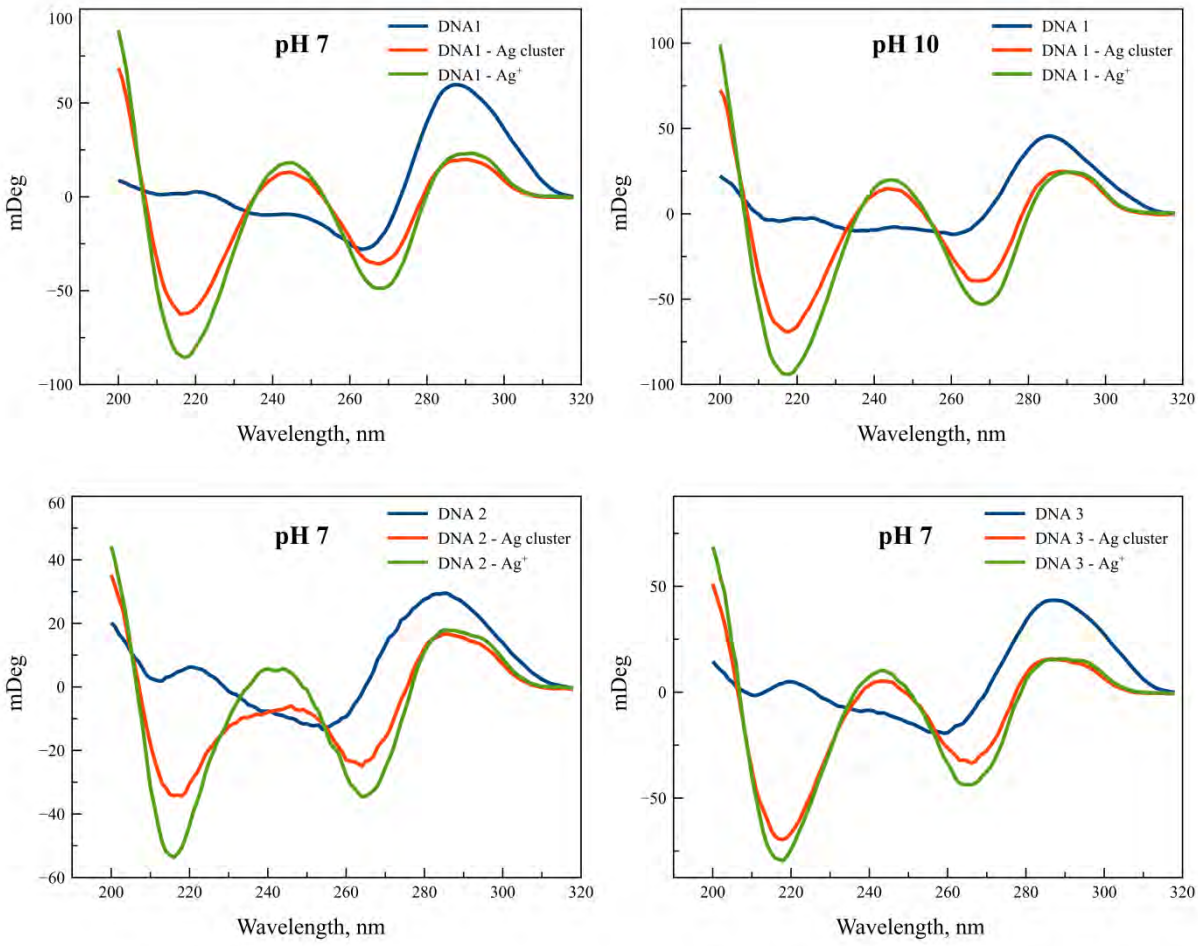


Рис. 5.2.3. CD спектры матриц ДНК и их комплексов с катионами и кластерами серебра при соотношении 0,5 Ag^+ / основание [51].

Взаимодействие ионов Ag^+ с основаниями приводит к образованию вторичной структуры ДНК, стабилизированной C-Ag^+-C парами, что видно из характерного спектра CD (рис. 5.2.3), указывающего на образование пар C-Ag^+-C [154, 156]. В масс-спектре комплекса наблюдались комплексы ионов серебра только с одиночными цепями ДНК (таблица 5.2.1). Эти результаты показываают, что ДНК 1 образует шпильку, а не дуплекс. QM/MM оптимизированная структура шпильки ДНК 1, стабилизированной катионами Ag^+ [52], приведена на рисунке 5.2.4. Кривая плавления (рис. 5.2.5), а также спектр CD (рис. 5.2.3) показывают, что структура ДНК остается стабильной после образования кластеров.

Таблица 5.2.1. Распределения масс и количества катионов Ag^+, полученных для растворов ДНК при соотношении 0,5 Ag^+/основание для ДНК 2 и 3, 1 Ag^+/ основание для ДНК 1. Все пики соответствуют одиночным цепочкам ДНК [51].

ДНК 1

Масса	число атомов серебра	Интенсивность
3784,22	3	2300
3888,05	4	3100
3950,25	5	2250
4055,14	5	3200
4115,2	6	1250
4225,14	7	2800
4285,14	7	1000
4390,13	8	1750

ДНК 2

Масса	число атомов серебра	Интенсивность
3481,56	0	1400
3589,48	1	1900
3696,36	2	4900
3909.19	4	5000
3802,27	3	14200
3840,16	3	1800
3946,12	4	1300

ДНК 3

Масса	число атомов серебра	Интенсивность
3801,28	3	12000
3810,3	3	5000
3839,24	3	12000
3909,15	4	12800
3917,22	4	6000
3947,1	4	1600
4015,06	5	1530

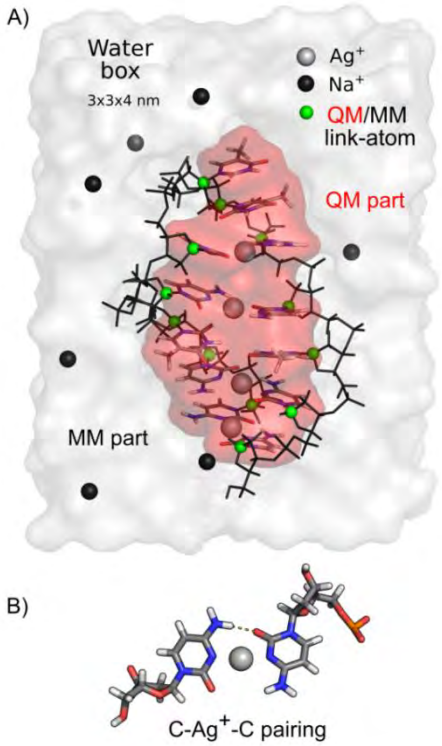


Рис. 5.2.4. QM/MM оптимизированные структуры шпильки ДНК 1, стабилизированной парами C-Ag^+-C (A), и пары C-Ag^+-C (B) [51].

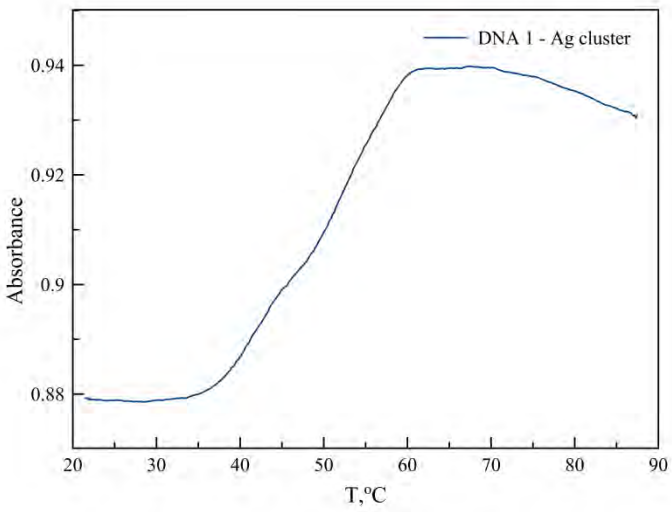


Рис. 5.2.5. Кривая плавления комплекса ДНК 1 – Ag кластер [51].

Далее был рассмотрен вопрос о местах связывания кластеров. Сайты связывания определялись путем варьирования последовательности ДНК и pH раствора. При этом важно, что во всех случаях матрица ДНК оставалась в форме

шпильки, стабилизированной парами C-Ag^{+}-C, что видно из соответствующих спектров CD и распределений MS (рис. 5.2.3 и таблица 5.2.1).

Таблица 5.2.2. Максимумы флуоресценции и интегральные интенсивности (а.е.) кластеров Ag на разных матрицах ДНК (спектры были получены через 2 месяца после синтеза, λex = 330 нм) [51].

ДНК	λ_{max}, нм	отн. интенсивность %	интегр. интенсивность, отн. ед.
ДНК 1, pH 7	410	20	0.3
CCTCCTTCCTCC	510	80	1.1
ДНК 1, pH 10	420	20	0.6
CCTCCTTCCTCC	500	80	2.7
ДНК 2, pH 7	420	20	0.3
CCACCTTCCACC	510	80	1.2
ДНК 3, pH 7	500	100	3.0
CCTCCAACCTCC			

В таблице 5.2.2 показаны интенсивности флуоресценции кластеров на разных матрицах ДНК, измеренные в одно и то же время после синтеза. Как видно, замещение тимина аденином в стволе шпильки (ДНК 2) не влияет на образование фиолетового кластера, а замена тиминов на аденины в петле шпильки (ДНК 3) приводит к исчезновению фиолетового излучения. Эти наблюдения указывают на то, что фиолетовый кластер связан с тиминами в петле. Другая важная особенность заключается в том, что депротонирование атомов N3 тиминов при pH 10 практически не влияет на образование кластеров на последовательности ДНК 1. Таким образом, карбонильные группы на тиминах в петле, вероятно, являются предпочтительными сайтами связывания фиолетового кластера в ДНК 1. Поскольку замена тиминов на аденины не влияет на образование зеленого

кластера, разумно предположить, что зеленый кластер расположен на цитозинах в стволе шпильки. Это также подтверждается тем фактом, что аналогичный зеленый кластер наблюдается на полицитозинах [249]. Что касается красного кластера, то следует отметить, что кластеры Ag, излучающие в этом спектральном диапазоне, как было показано, могут располагаться в местах некомплементарности оснований. [152]. В нашем случае несоответствие TT в основе шпильки, очевидно, можно рассматривать как наиболее вероятное местоположение красного кластера.

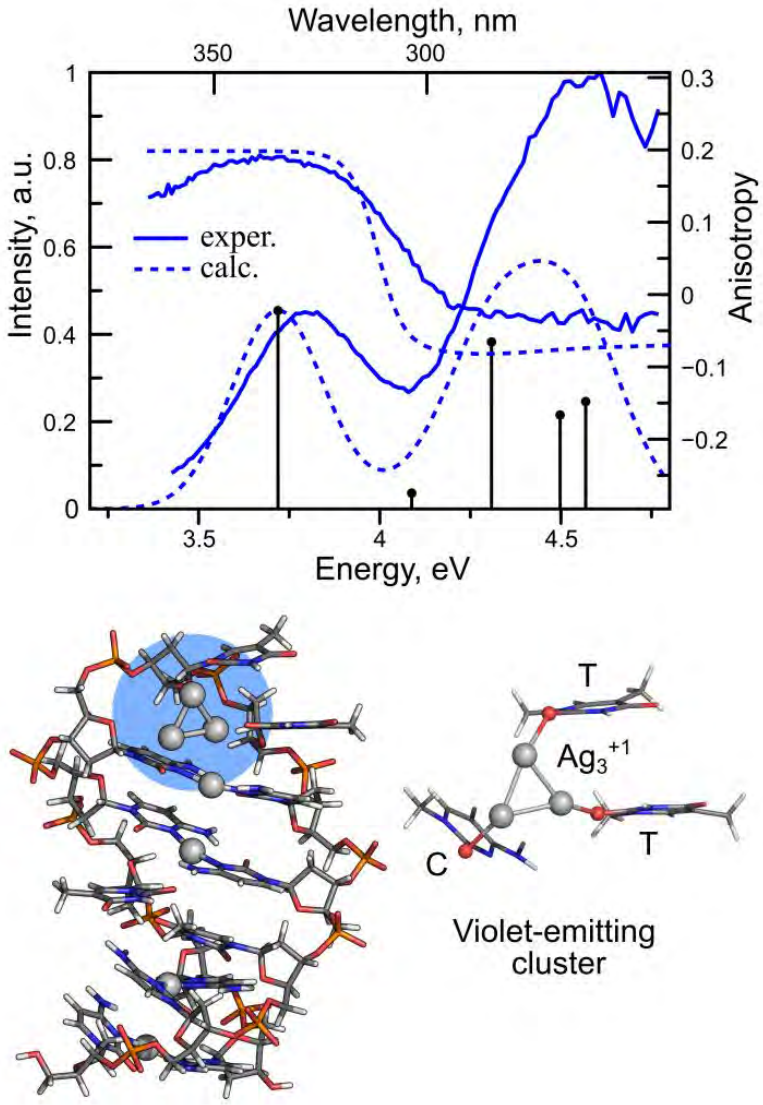


Рис. 5.2.6. QM/MM оптимизированная структура и соответствующие спектры возбуждения и анизотропии возбуждения фиолетового кластера Ag_3^{+1}, связанного с петлей шпильки ДНК 1 [51].

На рис. 5.2.6 представлены полученные структуры, рассчитанные спектры возбуждения и анизотропии возбуждения для фиолетового комплекса Ag-ДНК. Как видно, наблюдается хорошее согласие с соответствующими экспериментальными спектрами. Полоса поглощения на 4,5 эВ в основном обусловлена поглощением ДНК и может быть значительно недооценена в рассчитанном спектре из-за небольшого количества оснований в части QM.

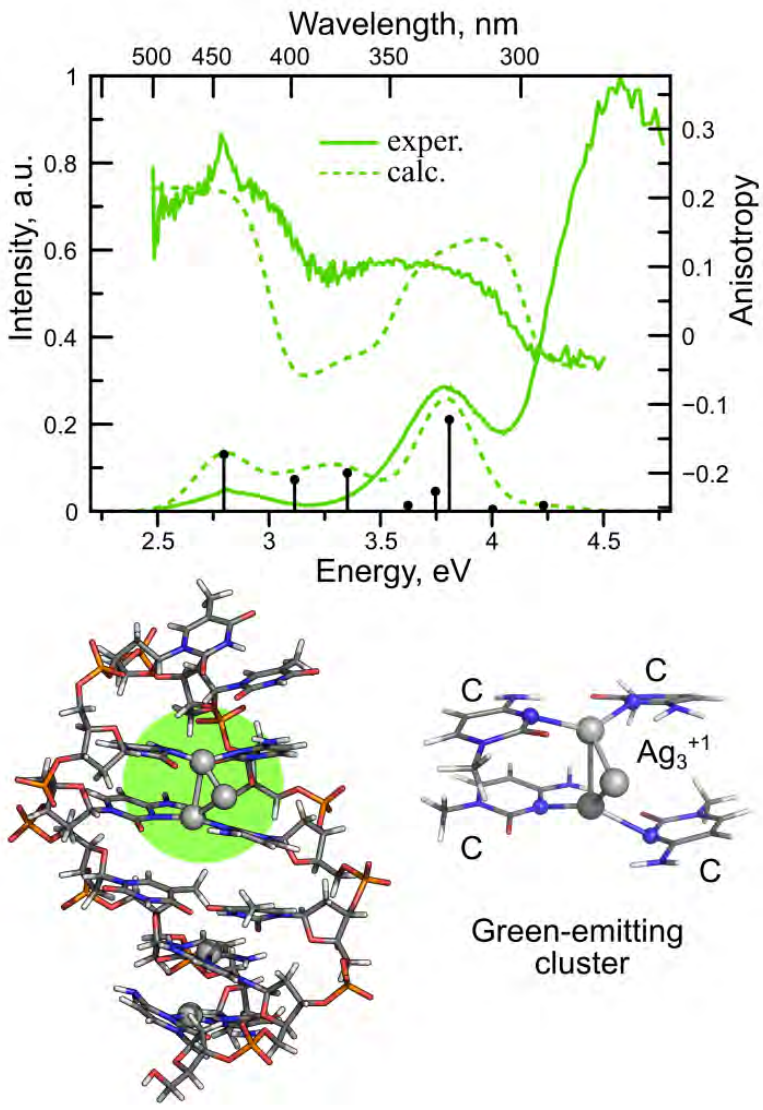


Рис. 5.2.7. QM/MM оптимизированная структура и соответствующие спектры возбуждения и анизотропии возбуждения зеленого кластера Ag_3^{+1}, связанного с цитозиновым участком в основе шпильки ДНК 1 [51].

Более высокая интенсивность, наблюдаемая для пика при 4,5 эВ в экспериментальном спектре возбуждения, по сравнению с рассчитанным спектром, может быть связана с эффективной передачей энергии от ДНК к кластеру, что отмечается для комплексов Ag-ДНК [117].

Полученная структура и соответствующие спектры для зеленого кластера Ag-ДНК показаны на рисунке 5.2.7. Более низкая интенсивность первого электронного перехода при 2,8 эВ по сравнению с переходом с более высокой энергией на 3,8 эВ может рассматриваться как индивидуальная особенность кластера. Эта особенность отличает его от других флуоресцентных комплексов Ag-ДНК, для которых самый низкий переход всегда является наиболее интенсивным переходом в диапазоне ниже 4 эВ [117]. Эта особенность зеленого кластера удовлетворительно воспроизводится в наших расчетах. Примечательно, что спектр кластера Ag_3^{+1}, связанного в этом случае с атомами цитозина N3, по-видимому, существенно отличается от спектра для того же кластера Ag_3^{+1}, но связанного с карбонильными группами тимина и цитозина (рис. 5.2.6). Это показывает, что взаимодействия кластер-матрица могут сильно влиять на спектральные свойства комплексов Ag-ДНК и указывает на то, что оптические спектры, рассчитанные для свободных кластеров Ag в качестве модельных систем, могут отличаться от соответствующих спектров комплексов Ag-лиганд.

Структура, полученная для красного кластера, представлена на рисунке 5.2.8. Форма спектра возбуждения красного кластера, характерная для большинства флуоресцентных кластеров Ag, очевидно, связана с нитевидной пространственной формой кластера [142, 250, 251]. Анализ молекулярных орбиталей, участвующих в переходе с наименьшей энергией, показывает, что небольшой перенос заряда между кластером Ag и основаниями ДНК вносит вклад в возбужденное состояние комплекса. Поскольку карбонильные n-орбитали и π-орбитали оснований участвуют в переходе, положение максимума поглощения кластера около 2,5 эВ очень чувствительно к взаимодействиям кластер-матрица. На рис. 5.2.9 и 5.2.10 показано влияние связывания кластеров с основаниями ДНК на спектр возбуждения. Учитывая эту чувствительность, смещение на 0,2 эВ, полученное в

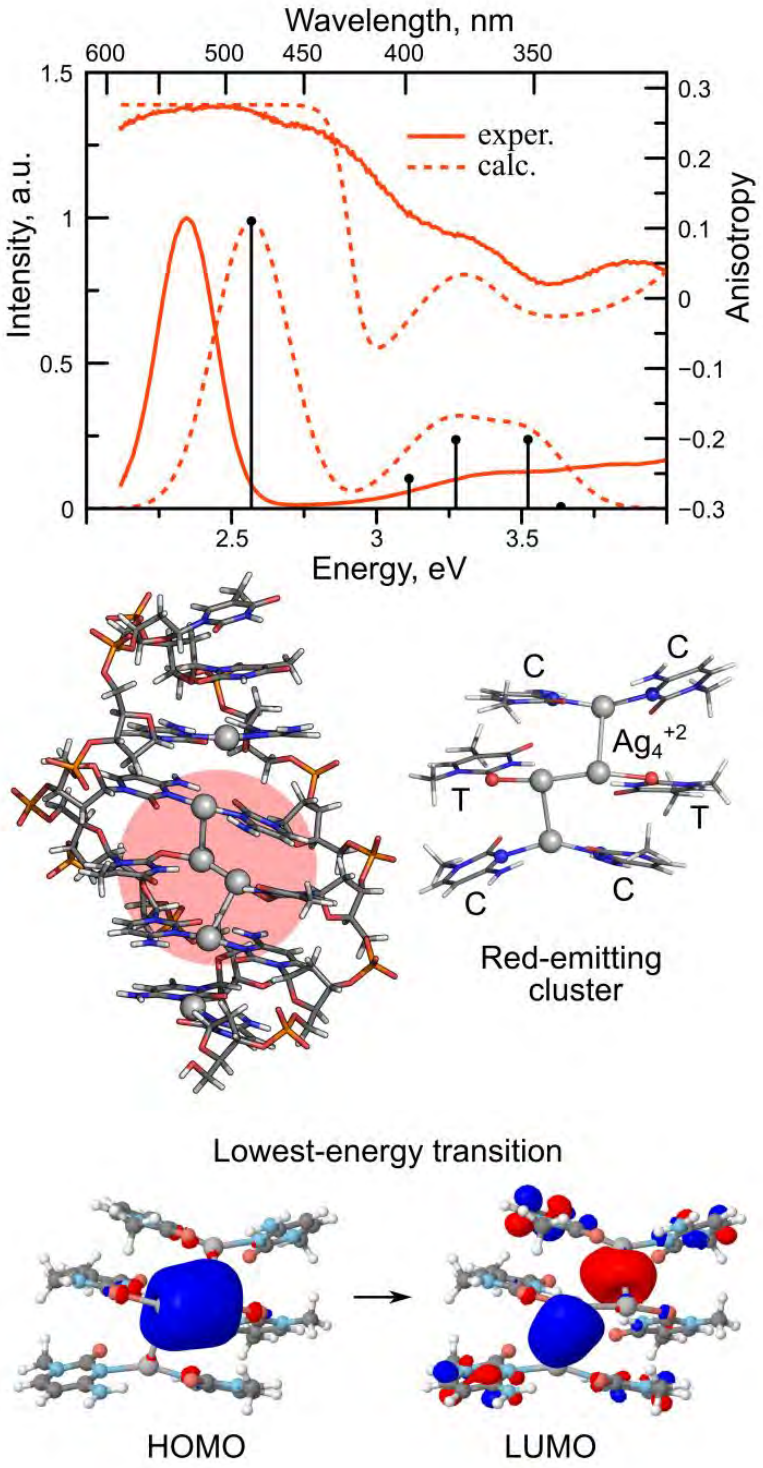


Рис. 5.2.8. QM/MM оптимизированная структура и соответствующие спектры возбуждения и анизотропии возбуждения красного кластера Ag_4^{+2}, связанного с TT сайтом в ДНК 1; NTO орбитали перехода в нижнее возбужденное состояние [51].

рассчитанном спектре относительно экспериментального максимума, может быть связано с возможными ошибками оптимизации геометрии.

Дополнительное подтверждение найденным структурам можно увидеть из рассчитанных спектров анизотропии возбуждения. Они достаточно хорошо воспроизводят особенности, наблюдаемые в экспериментальных спектрах (рис. 5.2.6-5.2.8). Поскольку спектры анизотропии очень чувствительны к относительному направлению переходных дипольных моментов, хорошее согласие между экспериментальным и расчетным спектрами подтверждает предложенные структурные модели.

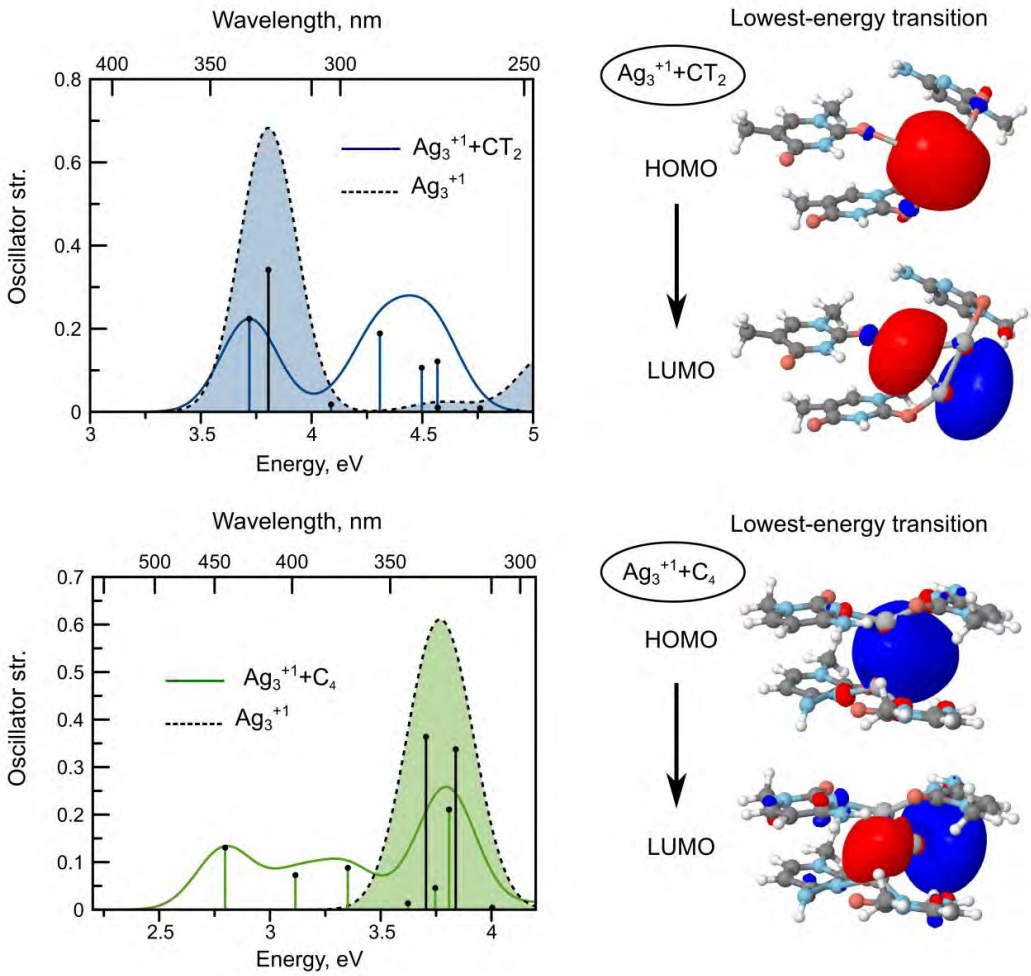


Рис. 5.2.9. Сравнение рассчитанных спектров возбуждения фиолетового (вверху) и зеленого (внизу) комплексов Ag_3^{+1}-ДНК с соответствующими спектрами для свободных кластеров; NTO орбитали участвующие в возбуждении комплексов [51].

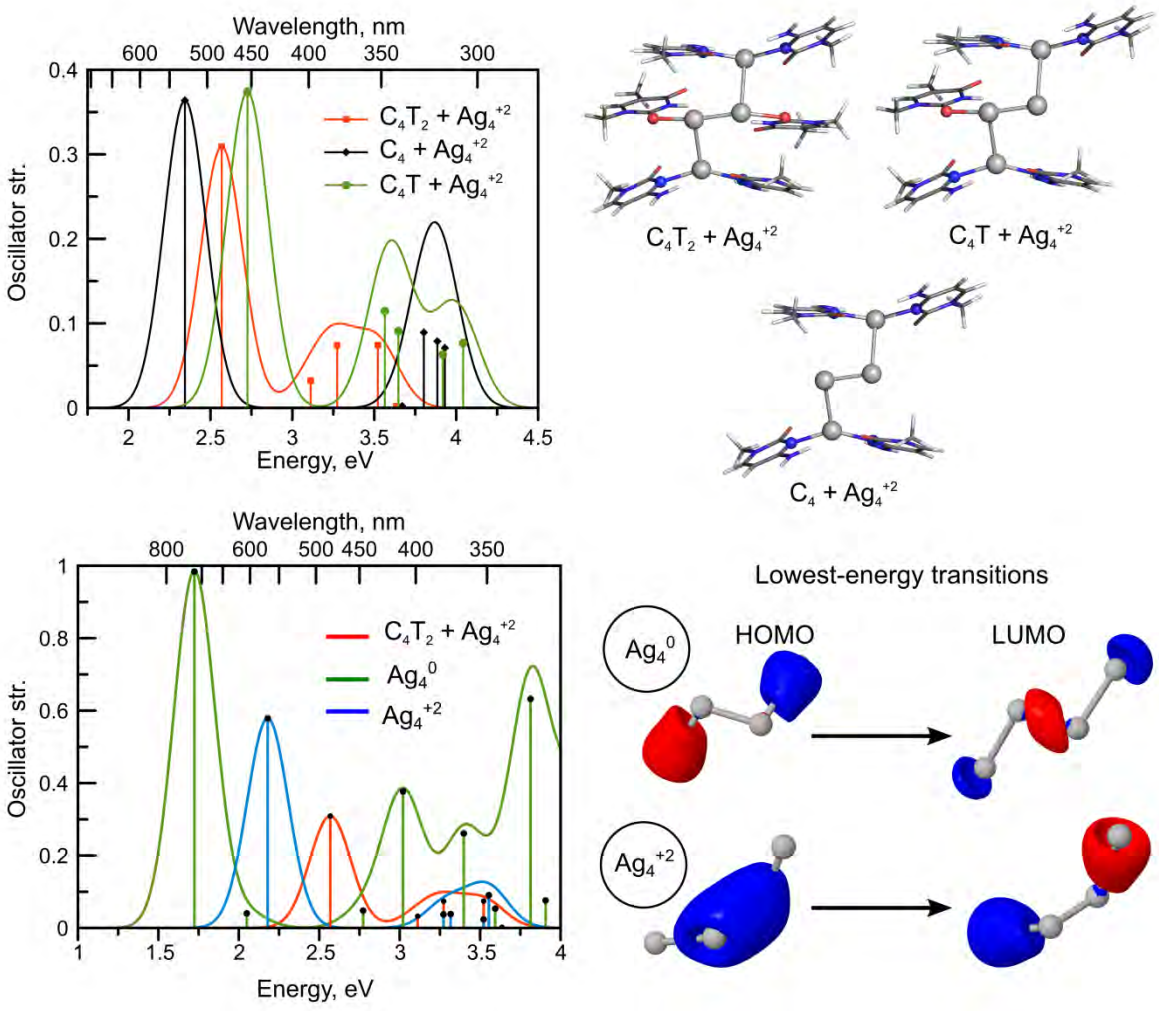


Рис. 5.2.10. Влияние связей тимин- Ag_4^{+2} на электронный спектр комплекса (вверху). C_4T_2+ Ag_4^{+2} - структура, полученная в результате QM/MM моделирования; C_4T+ Ag_4^{+2}, и C_4+ Ag_4^{+2} - один и тот же кластер с одной связью Ag-T и без связей Ag-T. Сравнение рассчитанного спектра возбуждения комплекса Ag_4^{+2}-ДНК (внизу) с соответствующими спектрами для свободных кластеров Ag_4^{+2} и Ag_4^{0}; НТО орбитали, участвующиет в возбуждении свободных кластеров [51].

Наша структурная модель для флуоресцентных комплексов отличается от общепринятой точки зрения. Принято считать, что заряд и размер кластеров металлов однозначно определяются экспериментальными значениями общего заряда металла и общей массы металла в комплексах металл-лиганд. В отличие от этого, в нашей модели кластер, то есть фактически хромофорная часть комплекса, состоит только из нескольких атомов серебра (Ag_3^{+1} или Ag_4^{+2}), а другие положительно заряженные атомы Ag должны только стабилизировать вторичную структуру ДНК. Следует отметить, что трехатомные кластеры Ag (Ag_3^{+1} или Ag_3^{0}) были идентифицированы как флуоресцентные центры в матрицах инертных газов и цеолитах [145-148].

5.3. Комплексы ионов серебра и кластеров с 15-мерным олигонуклеотидом.

Аналогичный подход был использован для определения структуры люминесцирующего кластера на олигонуклеотиде 5’-CGCCCCCCTCGGCGT-3’. На первом этапе мы изучили взаимодействие ионов Ag^+ с ДНК и структуру комплекса ДНК-Ag^+. Сначала экспериментально были определены места связывания серебра с ДНК. Для этой цели мы изучили XPS спектры комплексов [55].

Перед рассмотрением комплексов ДНК с серебром, качество образца чистой ДНК, то есть стехиометрия и химический состав, было проверено. Для этой цели был получен обзорный спектр XPS в широком диапазоне энергий связи. Схематическая химическая структура фрагмента цепи ДНК, состоящего из оснований цитозина, тимина и гуанина, показана на рис. 5.3.1. Таблица 5.3.1 суммирует распределение компонент, относящихся к определенным химическим группам ДНК [252] и демонстрирует соответствие экспериментальных и теоретических значений для каждой группы в образце.

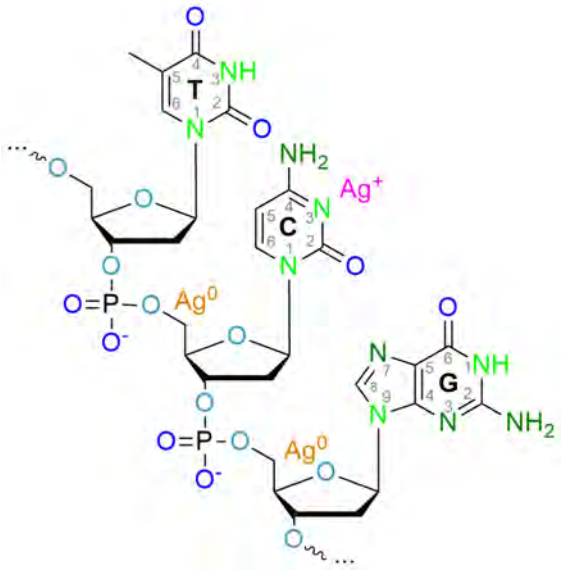


Рис. 5.3.1. Фрагмент цепи ДНК с основаниями тимина (T), цитозина (C) и гуанина (G). Цветовое представление атомов соответствует отнесению их к химическим группам ДНК: O_I - синий, O_{II} - светло-синий, N_I - зеленый, N_{II} - светло-зеленый [55].

Таблица 5.3.1. Энергии связывания XPS компонентов образца ДНК вместе с отнесением их к химическим группам ДНК [55].

Эл. Уровень	Хим. Группа	Символ	Энергия связи [55], eV	Энергия связи [252], eV	Экспер. содержание в образце, отн. ед.	Теор. содержание в образце, отн. ед.
N 1s	C-NH_2, C=N-C	N_I	399.4	399.1	3.5	3.6
	N-C-O, N-C=O	N_{II}	400.8	400.7		
O 1s	C=O, P=O, P-O-	O_I	531.3	531.6	10.1	6.4
	C-O-C, C-O-P	O_{II}	532.8	533.3		
P 2p	PO_4^-		133.5	133.8	1.0	1.0

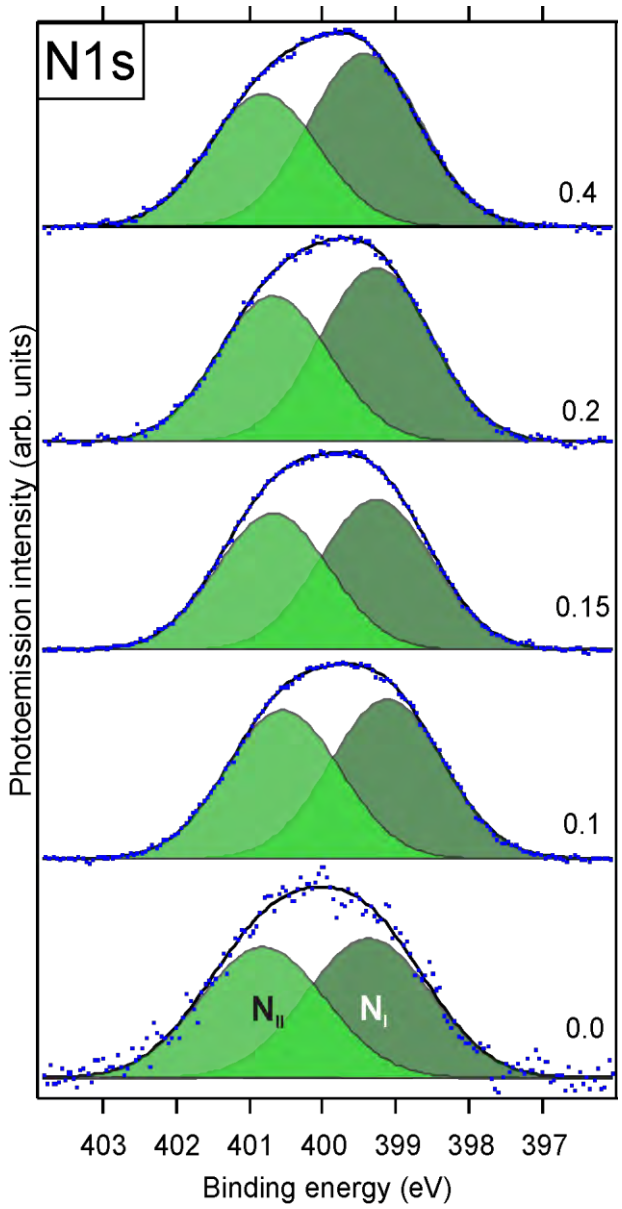


Рис. 5.3.2. Эволюция спектра остовного уровня N 1s образца Ag^{+}-ДНК с увеличением r. Спектры нормированы по интегральной площади и разложены на две компоненты. Значения $r = [Ag^{+}]/[DNA_{base}]$ показаны справа [55].

Для более детального анализа химического состава детальные спектры XPS с высокой разрешающей способностью представлены на рисунках 5.3.2 и 5.3.3 вместе с разложением на компоненты, что позволяет определить процентное содержание каждой компоненты.

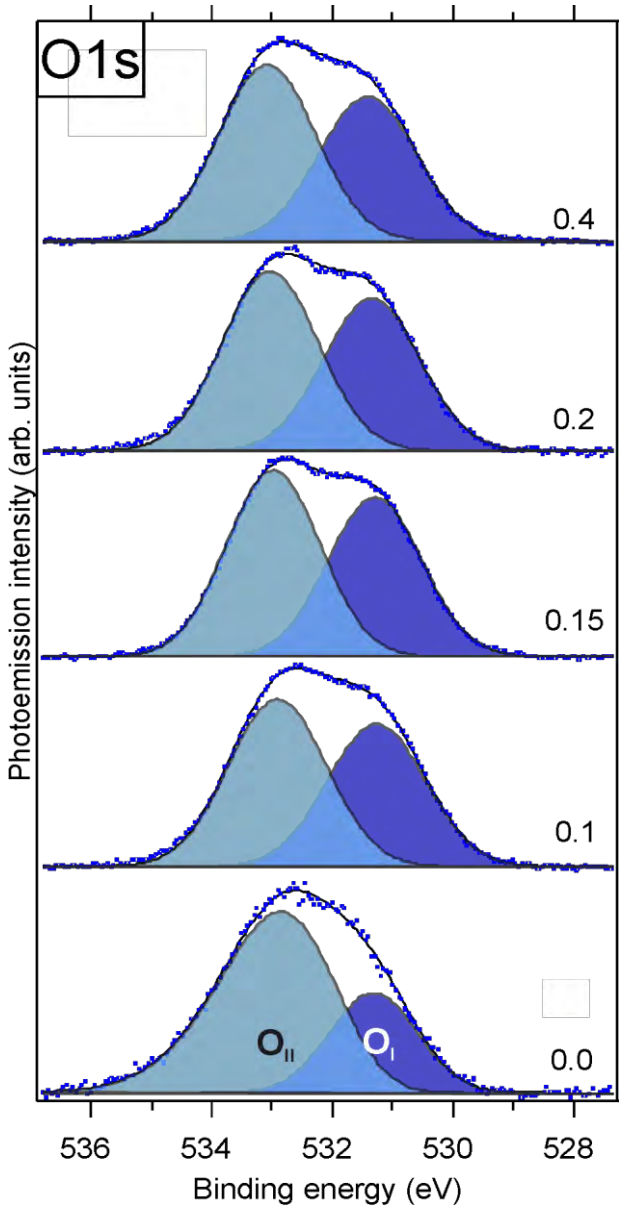


Рис. 5.3.3. Эволюция спектра остовного уровня O 1s образца Ag^{+}-ДНК с увеличением r. Спектры нормированы по интегральной площади и разложены на две компоненты. Значения $r = [Ag^{+}]/[DNA_{base}]$ показаны справа [55].

Спектр N 1s (рис. 5.3.2, внизу) может быть разложен на два пика, возникающих из-за различных химических состояний атомов азота. Пик N_I с энергией связи 399,4 эВ соответствует атомам азота в группах $C\text{-}NH_2$, C = N-C, тогда как компоненту N_{II} при 400,8 эВ можно отнести к эмиссии электронов от атомов азота в группах N-C-O и N-C=O. Следует отметить, что измеренные концентрации азота оказались близкими к теоретически ожидаемым значениям.

Спектр O 1s (рис. 5.3.3, внизу) также может быть разложен на два компонента, где O_I с энергией 531,3 эВ соответствует C = O, P = O, PO-группам и O_{II} с максимумом 532,8 эВ может быть отнесена к C-O-C, C-O-P группам ДНК. Компонента O_{II} может также включать полосу кислорода из воды, адсорбированной на дефектах расщепления графита или на пленке ДНК. Действительно, мы наблюдали полосу XPS с максимумом 532,4 эВ на подложке HOPG с высохшей каплей чистой воды. Также было обнаружено, что общая экспериментальная доля кислородного компонента несколько выше, чем ожидается теоретически, предположительно из-за неконтролируемого содержания воды в пленке ДНК и графитовых трещинах. По этим причинам, детальный анализ O 1s спектра ДНК в наших условиях сильно неопределенен из-за неконтролируемого присутствия воды в образцах.

Спектр N 1s комплексов ДНК с ионами серебра ДНК-Ag^+ демонстрирует явное перераспределение между компонентами N_I и N_{II} с увеличением отношения Ag/ ДНК (рис. 5.3.2). Такое поведение можно понимать как сдвиг доли компонента N_{II} в сторону более низких энергий связи. Этот эффект подразумевает увеличение электронной плотности на сайтах N_{II} в результате связывания Ag+ с атомами азота N_{II}. Такими атомами являются атомы N3 цитозина (рис. 5.3.1). Таким образом, при заданном $r \leq 0{,}4$ и содержании цитозина (60% оснований) большинство ионов Ag+ связывается с N3 атомами цитозина, что соответствует принятым представлениям в литературе [253-255]. Ионы Ag+ также могут связываться с атомами гуанина N7 [253], единственными сайтами типа N_I. Однако высокое соотношение цитозин / гуанин (9/4) в ДНК подразумевает преимущественное связывание ионов Ag+ с цитозинами.

Эволюция спектра O 1s с увеличением отношения [Ag+] / [DNA_{base}] показана на рис. 5.3.3. Избыток O_{II} наблюдается для чистого образца ДНК, что было объяснено выше вкладом воды на поверхности HOPG. Примечательно, что при $r \geq 0{,}1$ наблюдаемое отношение O/P приближается к ожидаемому значению 6,4, и в диапазоне r = 0,1-0,4 не наблюдается значительных спектральных изменений, что подразумевает отсутствие взаимодействия ионов Ag+ с атомами кислорода. Этот

факт согласуется с общепринятым мнением, что ионы Ag+ первично взаимодействуют с азотами оснований ДНК [253-256]. Таким образом, в олигонуклеотиде 5’-CGCCCCCCTCGGCGT-3’ ионы серебра связаны преимущественно с N3 атомами цитозина. Как уже отмечалось выше, взаимодействие ионов серебра с цитозинами в ДНК приводит, как правило, к образованию неканонических пар C-Ag^{+}-C и, соответственно, образованию шпилек (как для 12-мера) или дуплексов. Для данного 15-мера было экспериментально установлено образование дуплекса [132].

Далее, мы получили QM/MM оптимизированную структуру DNA-Ag^{+} комплекса. Оптимизированная равновесная структура 15-мерного дуплекса ДНК, стабилизированного катионами Ag+, показана на рис. 5.3.4. Далее, модификации последовательности ДНК позволили нам определить возможные сайты связывания кластера. Так замена тимина на цитозин в середине последовательности приводит к исчезновению излучения с длиной волны 560 нм (рис. 5.3.5). Это говорит о том, что атомы Ag кластера связаны с основаниями некомплиментарной пары CT, как это было в случае кластера Ag_4^{+2} на 12-мерных кластерах ДНК [51] и Ag на дуплексе ДНК [152]. После этого QM/MM моделирование системы было выполнено с добавленными атомами серебра в местах пар CT. Число атомов Ag и заряд кластера варьировались до достижения разумного согласия между экспериментальным и расчетным спектрами кластера. Найденная таким образом структура, полученная для хромофорного ядра комплекса Ag_6^{+2}-ДНК, представлена на рисунке 5.3.6.

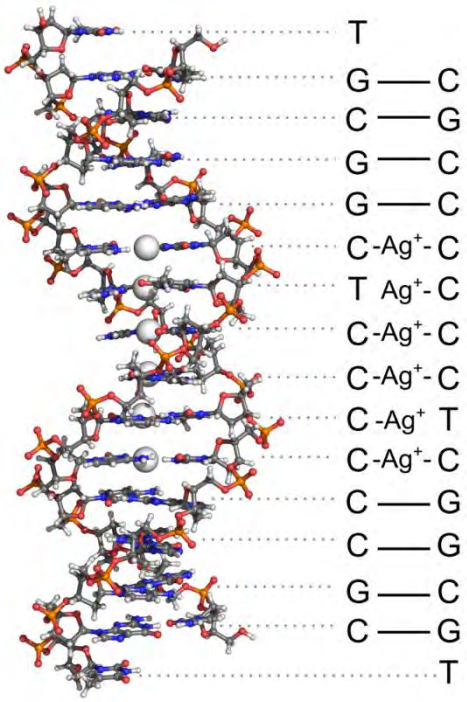


Рис. 5.3.4. QM/MM оптимизированная структура комплекса дуплекса ДНК 5’-CGCCCCCCTCGGCGT-3’ с 6 ионами серебра [56].

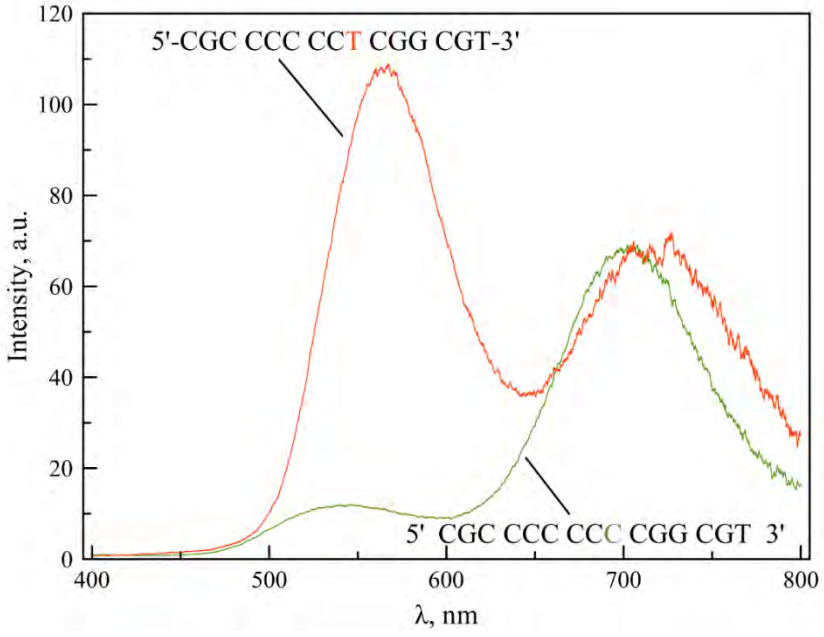


Рис. 5.3.5. Спектры флуоресценции кластеров Ag, синтезированных на исходной 15-мерной ДНК (красная) и на 15-мерной ДНК с замещением T9-C9 (зеленая) [56].

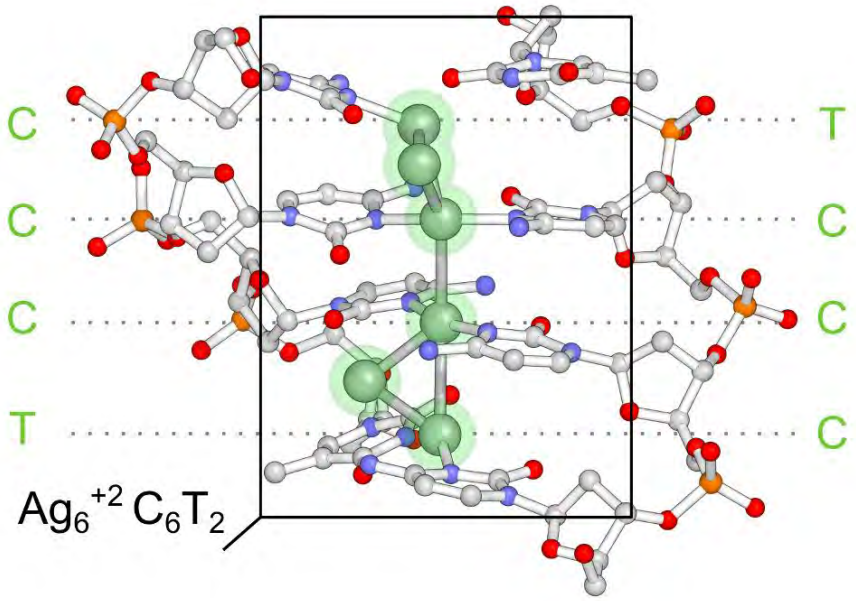


Рис. 5.3.6. QM/MM оптимизированная структура хромофора комплекса Ag_6^{+2} – ДНК [56].

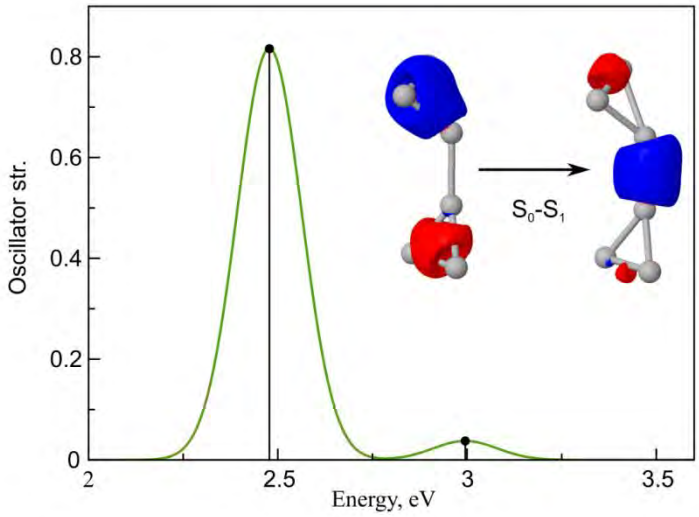


Рис. 5.3.7. Спектр поглощения Ag_6^{+2} кластера. Орбитали NTO первого перехода [56].

Расчетный спектр возбуждения кластера показан на рис. 5.3.7. Полученный бóльший размер этого кластера по сравнению с кластером Ag_4^{+2} хорошо коррелирует с тем фактом, что он имеет в два раза большее экспериментальное

сечение поглощения, чем кластер Ag_4^{+2} (как видно из расчетных спектров и экспериментальных значений коэффициента поглощения).

5.4. Выводы к главе 5.

Ионы серебра в комплексах с ДНК связываются с цитозинами, формируя пары C-Ag^+-C, стабилизирующие дуплексы ДНК. Люминесцирующие кластеры серебра на ДНК имеют протяженную структуру. Спектр свободных нитевидных кластеров сильно зависит от углов изгиба звеньев цепочки. Протяженная структура кластеров стабилизирована двумя параллельными цепочками ДНК. Результаты QM/MM моделирования комплексов показывают, что их хромофорные центры состоят из 3-6 атомов серебра с положительным зарядом кластера. Нами получены оптимизированные структуры кластеров Ag_3^{+1}, Ag_4^{+2}, Ag_6^{+2}, излучающих в фиолетовой, зеленой и красной областях спектра. На спектр кластера оказывает влияние взаимодействие с азотистыми основаниями.

ГЛАВА 6. ДИНАМИКА ЭЛЕКТРОННО-ВОЗБУЖДЕННЫХ СОСТОЯНИЙ В КОМПЛЕКСАХ ДНК С КЛАСТЕРАМИ СЕРЕБРА

6.1. Образование темновых состояний в комплексах.

Не смотря на то, что значительное количество различных ДНК-стабилизированных нанокластеров серебра уже синтезировано, динамика их возбужденных состояний, в частности образование темнового состояния, мало изучены. Между тем флуорофоры с темновыми состояниями в последние годы вызывают повышенный интерес в флуоресцентной микроскопии [257]. Темновые неизлучающие состояния нанокластеров Ag, например, предлагается использовать в оптически модулированной флуоресцентной визуализации [258]. Несмотря на простой химический синтез, все еще существует проблема, заключающаяся в том, что химический выход флуоресцентных кластеров в смеси зачастую не превышает нескольких процентов. Полученные кластерные растворы Ag представляют собой сильно гетерогенные системы с множественным присутствием нефлуоресцирующих частиц и нуждаются в дальнейшей очистке для выделения флуоресцентных кластеров. Большинство исследований касалось неочищенных растворов, что затрудняло исследование фотофизических свойств флуоресцентных кластеров. Как следствие, большинство данных, представленных в литературе о квантовых выходах и сечениях поглощения кластеров, являются сомнительными, поскольку доля флуоресцентных кластеров не приводится.

В данном разделе мы представляем метод для непосредственного измерения сечения поглощения флуоресцентных кластеров в смеси синтезированных частиц, а также для определения констант скорости для темнового состояния кластеров. При этом мы модифицировали метод спектроскопии насыщения флуоресценции [167], используя три различных режима возбуждения импульса, а именно пикосекундный и наносекундный импульсы, а также CW (непрерывное) возбуждение [47, 48, 50]. Мы изучали кластеры Ag, излучающие на длине волны

около 620 нм на 12-мерной одноцепочечной ДНК 5’-CCTCCTTCCTCC-3’ (ДНК 1), рассмотренные в предыдущей главе и на ДНК тимуса теленка (СТ ДНК).

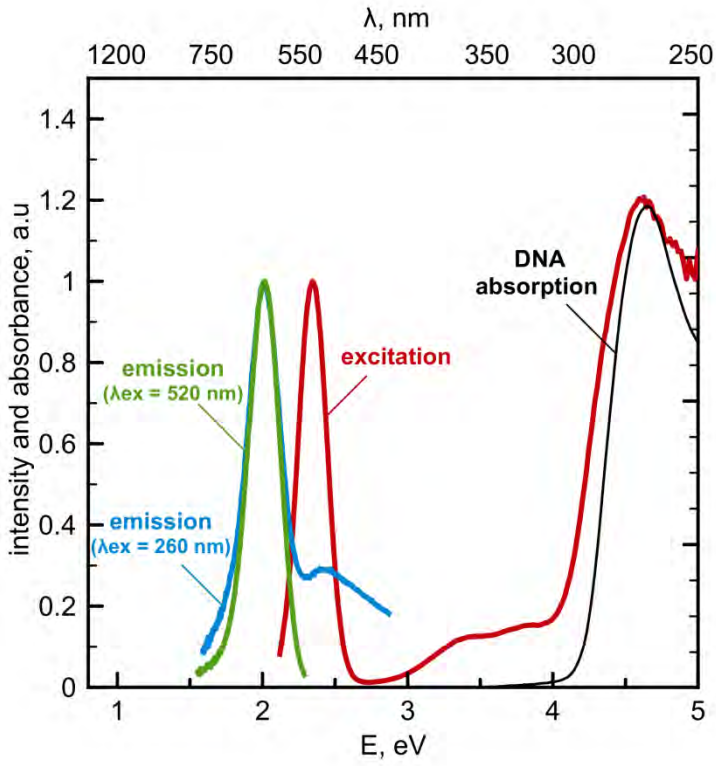


Рис. 6.1.1. Спектры возбуждения и испускания флуоресценции кластеров Ag, люминесцирующих в красной области, синтезированных на 12-мерной ДНК 5’-CCTCCTTCCTCC-3’ [50].

Кластеры Ag, синтезированные при pH 5 на ДНК 1, имеют в основном один тип излучающих кластеров. Спектры поглощения, флуоресценции, возбуждения флуоресценции и поляризации возбуждения для кластеров с максимумами возбуждения / эмиссии при 529 нм / 620 нм показаны на рис. 6.1.1. Они такие же, как спектры при pH 6 в водном растворе, показанные выше на рис. 5.2.2A. Как видно из сравнения спектров возбуждения и поглощения (рис. 6.1.2), химический выход флуоресцентных кластеров представляется достаточно низким, и большинство видов представляют собой темные кластеры Ag и наночастицы. Даже на 529 нм вес красного кластера в общем поглощении остается неопределенным. Тем не менее, спектры флуоресценции практически не зависят

от длины волны возбуждения, указывая на то, что образуется один тип люминесцирующих кластеров.

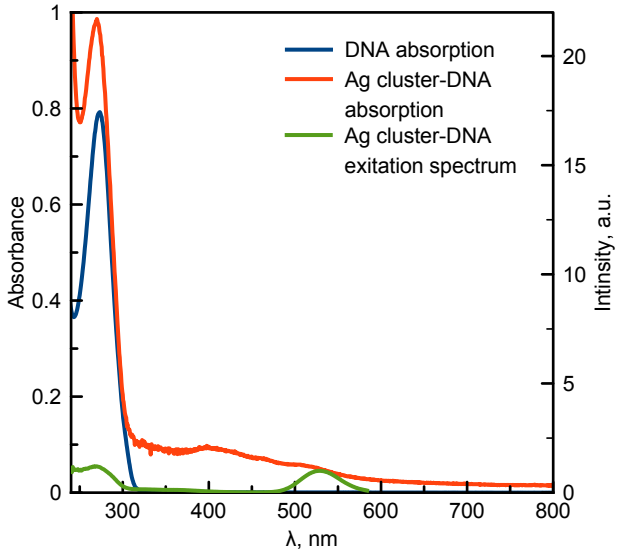


Рис. 6.1.2. Спектры поглощения ДНК 1 и кластеров Ag-ДНК после синтеза вместе с соответствующим спектром возбуждения (λ_p 620 нм) [50].

Большое количество темновых кластеров типично для неочищенных кластерных растворов. К сожалению, образец оказался нестабильным во время процедуры очистки ВЭЖХ, обычно используемой для комплексов ДНК-кластер [132]. Сравнение спектра возбуждения и поглощения после очистки показано на рис. 6.1.3. Поскольку только один излучающий кластер вносил вклад в спектр излучения флуоресценции при возбуждении при 530 нм, дальнейшие измерения с использованием метода насыщения флуоресценции проводились с неочищенными растворами.

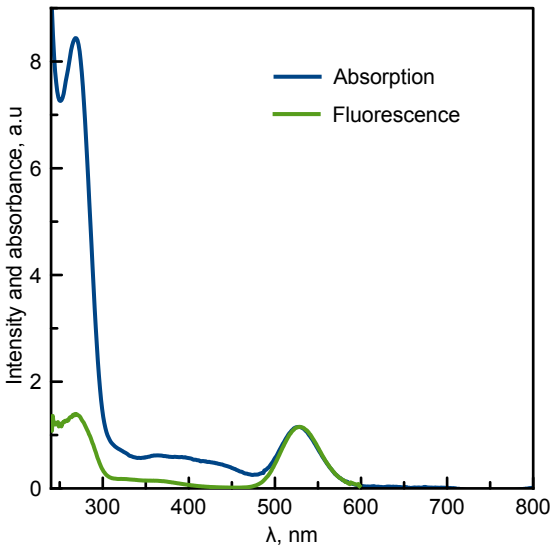


Рис. 6.1.3. Спектры поглощения и возбуждения наиболее обогащенной фракции Ag кластера на цепи ДНК 1, полученной в результате ВЭЖХ очистки [50].

Время жизни флуоресценции кластеров составило 2 нс. Такое же значение было получено в работе Richards et al. [247]. Схема фотофизических процессов с участием трех электронных состояний кластера Ag представлена на рис. 6.1.4.

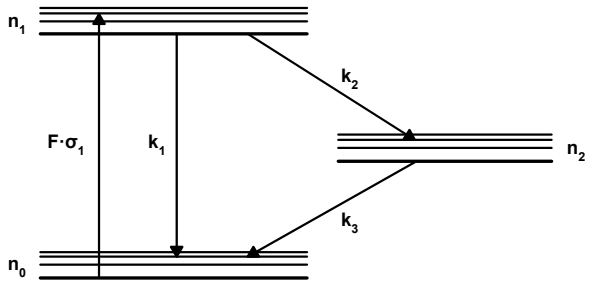


Рис. 6.1.4. Схема фотопроцессов используемая в нашей модели для флуоресцентного кластера [50].

Трехуровневая модель фотопроцессов в Ag кластерах включает возбуждение и дезактивацию первого синглетного состояния, а также образование и дезактивацию темнового состояния. Его можно описать с помощью ряда следующих кинетических уравнений для разбавленного раствора:

$$\frac{dn_0(t)}{dt} = -F(t)\sigma_1 n_0(t) + k_1 n_1(t) + k_3 n_2(t)$$
$$\frac{dn_1(t)}{dt} = F(t)\sigma_1 n_0(t) - k_1 n_1(t) - k_2 n_1(t)$$
$$\frac{dn_2(t)}{dt} = k_2 n_1(t) - k_3 n_2(t)$$
$$c = n_0 + n_1 + n_2 \qquad (1).$$

Здесь n_0, n_1 и n_2 - концентрации кластеров в основном, первом синглетном и темновом состояниях; c - общая концентрация кластеров; F - поток фотонов возбуждения; σ_1 - сечение поглощения; k_1 - скорость дезактивации синглета; $k_1 + k_2 = \tau^{-1}$, где τ - время жизни флуоресценции, а k_2 - скорость перехода из синглетного состояния в темное состояние; k_3 - скорость дезактивации темного состояния. При наносекундном и пикосекундном возбуждении заселением основного состояния из темнового состояния можно пренебречь, так как ожидаемое время жизни темновых состояний кластеров Ag будет составлять приблизительно 10 микросекунд [259].

В случае возбуждения пикосекундным импульсом, когда ширина импульса $t_p \ll \tau$, уравнения (1) упрощаются до:

$$\frac{dn_0(t)}{dt} = -F(t)\sigma_1 n_0(t)$$
$$c = n_0 + n_1 \qquad (2).$$

Эта система может быть решена аналитически. Интегрирование дифференциального уравнения дает:

$$ln\frac{n_0(t_p)}{n_0(0)} = -\int_0^{t_p} F(t)\sigma_1\, dt = -\frac{\sigma_1 E}{sh\nu},$$

где $E = h\nu s\int_0^{t_p} F(t)\, dt$ –энергия импульса, s – площадь пучка, h – константа Планка и ν – частота света.

Так как $n_0(0) = c$, мы получаем:

$$n_1 = c(1 - e^{-\frac{\sigma_1 E}{shv}}) \quad (3).$$

Интенсивность флуоресценции пропорциональна n_1 и может быть получена как:

$$I_{fl} = A(1 - e^{-\frac{\sigma_1 E}{shv}}) \quad (4),$$

где A - произведение инструментального фактора и квантового выхода флуоресценции.

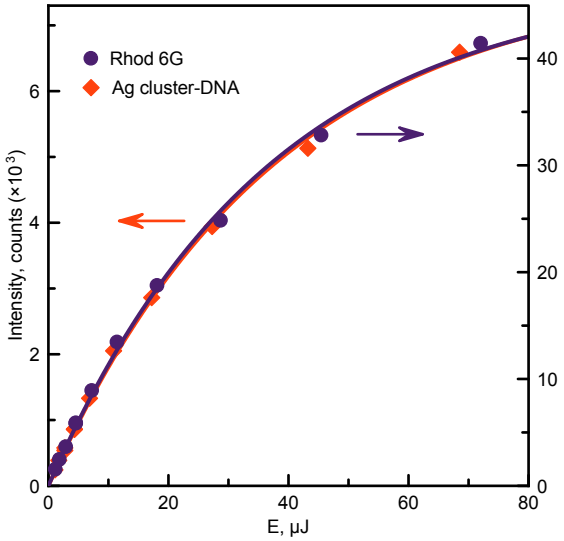


Рис. 6.1.5. Зависимость интегральной интенсивности флуоресценции от энергии импульса для Rhod 6G (λ_{em} = 540 - 600 нм) и Ag кластеров (λ_{em} = 580 - 620 нм) при пикосекундном возбуждении [50].

Референсные измерения сечения поглощения были сделаны для раствора родамина (Rhod 6G). Кривые насыщения, полученные для Rhod 6G и Ag кластеров, приведены на рис. 6.1.5. Апроксимация данных уравнением (4) дает значение (4,1 ± 0,4)·10^{-16} $см^2$ для сечения поглощения Rhod 6G, которое совпадает с литературным значением [260]. Ag Для кластера кривая насыщения практически совпадает с кривой, полученной для Rhod 6G, что предполагает близкое значение сечения поглощения. Апроксимация данных для кластера дает значение (3,5 ±

0,3)·10^{-16} $см^2$, или (0.90±0.08)·10^4 $М^{-1}·см^{-1}$. Для сравнения, значение, полученное для того же кластера с использованием флуоресцентной корреляционной спектроскопии (FCS), составляет (1.2±0.3)·10^4 $М^{-1}·см^{-1}$ [247], что на 30% выше, чем значение, полученное нашим методом. Стоит отметить, что FCS дает абсолютную концентрацию флуоресцентных кластеров. Чтобы рассчитать коэффициент поглощения флуоресцентных кластеров, необходимо знать их относительный вклад в поглощение в сложной смеси излучающих и неизлучающих кластеров и частиц. Если относительный вес флуоресцентных кластеров в общем поглощении достаточно низок, это может привести к завышению сечения поглощения в методе FCS. В этом отношении спектроскопия насыщения флуоресценции является единственным прямым методом оценки поглощения флуоресцентных кластеров.

В случае наносекундного импульса, когда ширина импульса сравнима с временем жизни синглетного возбужденного состояния, численное решение уравнений (1) позволяет получить константу скорости образования темнового нефлуоресцирующего состояния. Кривые насыщения флуоресцентного отклика для Rhod 6G и Ag кластера показаны на рис. 6.1.6. Как видно, кривые для красителя и кластера в этом случае различны в отличие от случая возбуждения пикосекундным импульсом. Такая разница указывает на относительно высокую эффективность образования темнового состояния кластера Ag по сравнению с красителем, для которого скорость образования темнового триплетного состояния достаточно мала (~10^6 $с^{-1}$ [261, 262]).

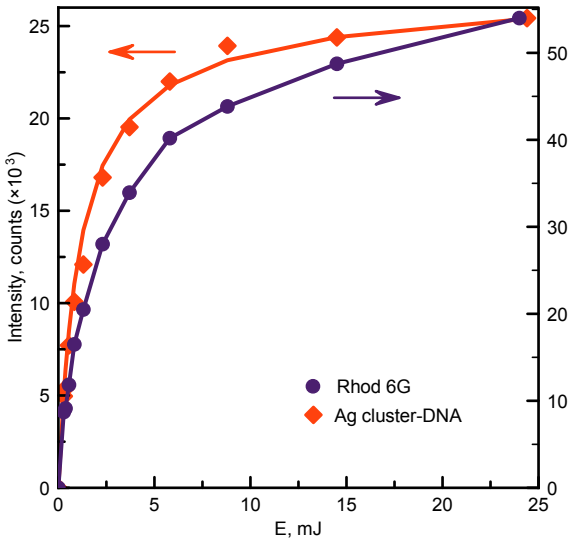


Рис. 6.1.6. Зависимость интенсивности флуоресценции от энергии импульса для Rhod 6G и Ag кластеров при возбуждении наносекундным импульсом. Данные для кластеров Ag численно моделировались с использованием трехуровневой модели (1). Данные для родамина показаны в сравнении с кластером [50].

Численное решение уравнения (1) позволило получить значение k_2=(0.9±0.1)·10^8 c^{-1}. Значение эффективности образования темнового состояния составило 17 ± 3%. Предполагалось, что темновые состояния в кластерах Ag на основе ДНК являются результатом фотоиндуцированного переноса электронов из кластера в ДНК [164]. Для кластеров Ag, излучающих в ближней ИК-области, выход темнового состояния составлял несколько процентов [164]. Выход темнового состояния, вероятно, определяется структурой кластеров Ag, вероятно, числом атомов серебра и зарядом кластера, что может значительно изменить окислительно-восстановительные свойства кластеров.

Используя режим CW возбуждения, мы оценили скорость дезактивации темнового состояния. В этом случае равновесные концентрации определяются следующей системой линейных уравнений:

$$F\sigma_1 n_0 = n_1 k_1 + n_2 k_3$$
$$n_1 k_2 = n_2 k_3$$
$$c = n_0 + n_1 + n_2 \qquad (5).$$

Решая эту систему, мы получаем n_1:

$$n_1 = c \cdot \frac{F\sigma_1}{F\sigma_1\left(1+{}^{k_2}/_{k_3}\right)+k_1+k_2} \quad (6),$$

и, наконец, интенсивность флуоресценции может быть выражена как:

$$I_{fl} = a \cdot \frac{{}^{\sigma I_{ex}}/_{h\nu}}{{}^{\sigma I_{ex}}/_{h\nu}\left(1+{}^{k_2}/_{k_3}\right)+1/\tau} \quad (7),$$

где a - постоянная, пропорциональная концентрации и скорости излучения, I_{ex} - интенсивность возбуждения.

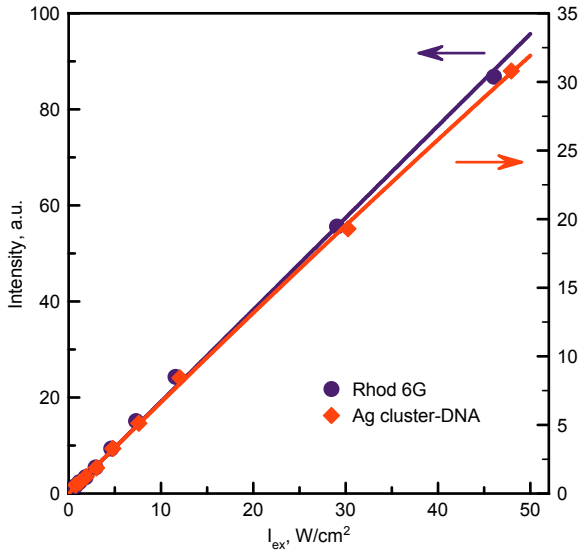


Рис. 6.1.7. Зависимость интенсивности флуоресцентнции кластеров и Rhod 6G от интенсивности CW-возбуждения. Начальные наклоны кривых совпадают [50].

Кривые насыщения, полученные для Rhod 6G и кластеров Ag при непрерывном возбуждении, показаны на рис. 6.1.7. Линейный график для Rhod 6G согласуется с относительно низким выходом триплетного состояния [261, 262]. Небольшое отклонение кривой для кластера Ag от графика Rhod 6G объясняется относительно высокой скоростью образования темнового состояния. К

сожалению, низкий сигнал позволил нам оценить скорость k_3 только приблизительно с ошибкой 50%. Апроксимация данных выражением (7) дает значение k_3 = 10 мкс$^{-1}$. Таблица 6.1.1 показывает константы скоростей фотопроцессов, полученных для красного кластера Ag на ДНК 1.

Таблица 6.1.1. Фотофизические константы красного Ag кластера на ДНК 1 [50].

σ_1, 10^{-16} cm^2	k_1, 10^8 s^{-1}	k_2, 10^6 s^{-1}	k_3, 10^6 s^{-1}
3.5±0.3[a]	4.2±0.1[b]	85±10[c]	0.1±0.05[d]

[a] – сечение поглощения на 530 nm; [b] – скорость дезактивации синглета; [c] – скорость образования темнового состояния; [d] – скорость дезактивации темнового состояния.

Спектры флуоресценции и ее возбуждения для кластеров на тимусной ДНК (СТ ДНК) показаны на рисунке 6.1.8. Время жизни флуоресценции для кластеров составило 2,4 нс [47]. Спектральные свойства кластеров аналогичны кластерам на 12-мере (ДНК 1). Кривые насыщения флуоресценции для Rhod 6G и Ag-ДНК показаны на рисунке 6.1.9. Апроксимация уравнением (4) дает значение сечения поглощения Rhod 6G (4,2 +/- 0,2) ·10^{-16} см^2, которое совпадает со значением, полученным обычным методом [260], что подтверждает правильность использованной модели. Значение сечения поглощения для кластера оказалось (3.8 +/- 0.2) ·10^{-16} см^2, что практически совпадает со значением, полученным выше для кластера на ДНК 1.

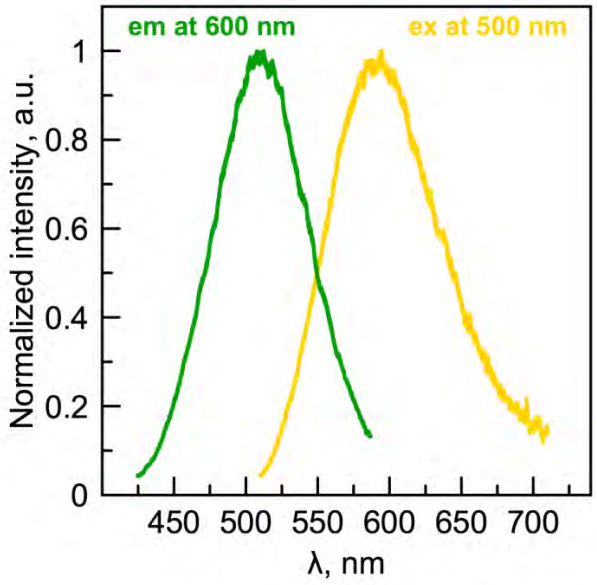


Рис. 6.1.8. Спектры возбуждения и испускания флуоресценции нанокластеров Ag, синтезированных на СТ ДНК. [47].

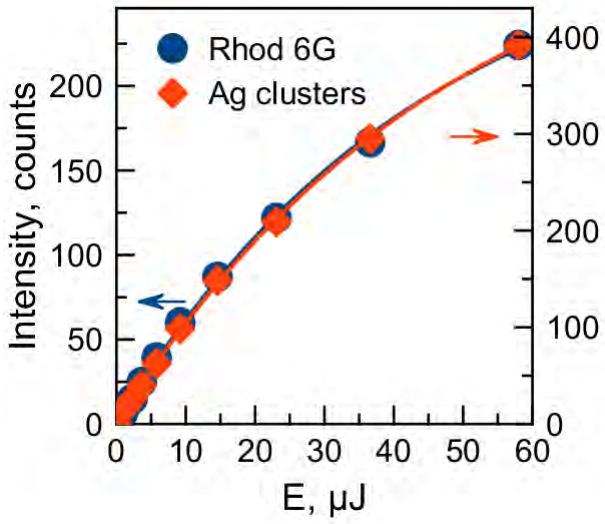


Рис. 6.1.9. Зависимость интенсивностей флуоресценции для Rhod 6G и Ag кластеров на СТ ДНК от энергии пикосекундного импульса [47].

Для наносекундного импульсного режима энергетические зависимости интенсивностей флуоресценции для Rhod 6G и Ag кластера показаны на рис. 6.1.10.

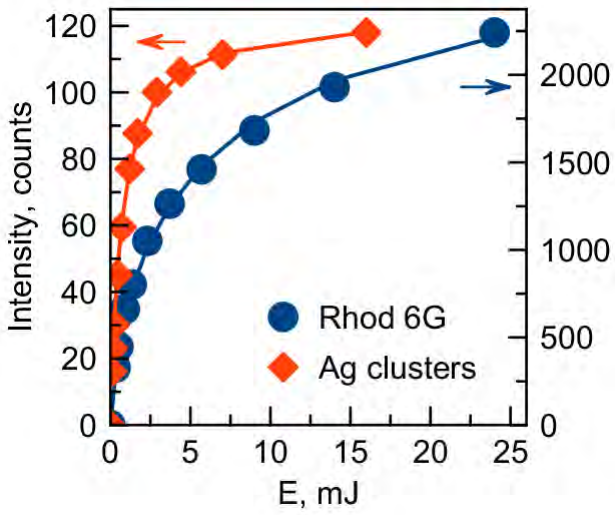


Рис. 6.1.10. Зависимость интенсивностей флуоресценции для Rhod 6G и Ag кластеров от энергии наносекундного импульса [47].

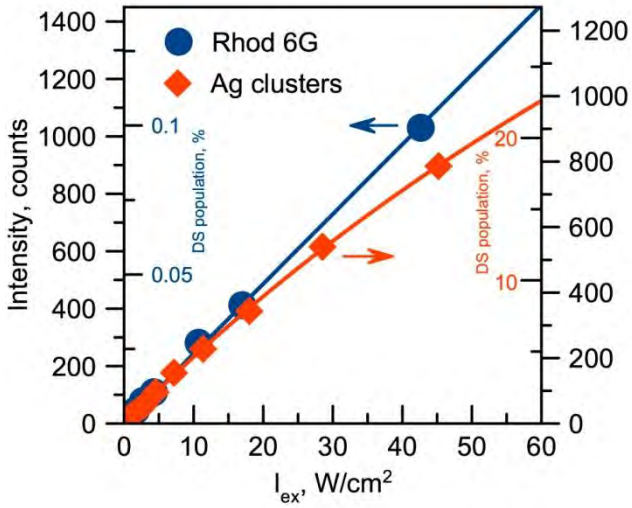


Рис. 6.1.11. Зависимость интенсивностей флуоресценции и заселенностей темнового состояния для Rhod 6G и Ag кластера от интенсивности CW возбуждения. Кривые масштабированы так, чтобы начальные наклоны совпадали [47].

На рисунке 6.1.11 показаны кривые насыщения, полученные для Rhod 6G и Ag кластеров в случае CW-возбуждения. Апроксимация кривой выражением (5) дает значение времени жизни темнового состояния 15 ± 5 мкс, близкое к аналогичному

значению для кластера на 12-мере ДНК. Фотофизические параметры кластеров на тимусной ДНК показаны в Табл. 6.1.2.

Таблица 6.1.2. Фотофизические константы Rhod 6G и нанокластеров Ag на СТ ДНК [47].

	σ_1, 10^{-16} см^2	σ_2, 10^{-16} см^2	k_1, 10^8 с$^{-1}$	k_2, 10^{12} с$^{-1}$	k_3, 10^6 с$^{-1}$	k_b, 10^{10} с$^{-1}$	k_5, 10^6 с$^{-1}$
Rhod 6G	4.43[a]	2.08[b]	2.53[c]	5[d]	2.5±0.5[e]	1.0±0.2[f]	0.49[g]
Ag-DNA	3.8±0.2[h]		3.2±0.1[i]		100±10[j]		0.06±0.02[k]

[a, b] - сечения поглощения для основного на 532 нм и первого синглетного состояния на 530 нм Rhod 6G, взятые из работ [260, 264]; [c] - константа скорости дезактивации первого синглета в основное состояние Rhod 6G, рассчитанная по известным значениям времени жизни синглета 3,9 нс [265] и полученному значению k_3; [d] - константа скорости для внутренней конверсии из более высокого синглетного состояния Rhod 6G, взятая из работы [266]; [e] - константа скорости интерконверсии из первого синглета Rhod 6G, определенная при возбуждении наносекундным импульсом; [f] - скорость фотовыцветания из высшего синглетного состояния Rhod 6G, определенная при возбуждении наносекундным импульсом. Интерконверсия в более высоком состоянии считается незначительной [266]; [g] - константа скорости дезактивации темнового состояния для Rhod 6G, взятая из [265]; [h] - сечение поглощения основного состояния кластеров, определенное в режиме пикосекундного возбуждения на 530 нм; [i] - константа скорости дезактивации первого синглета в основное состояние кластеров, определенная при возбуждении наносекундным импульсом с использованием значения времени жизни синглета 2,4 нс; [j] - константа скорости образования темнового состояния кластеров, определенная при возбуждении наносекундным импульсом; k - константа скорости деактивации темнового состояния для кластеров, определенная в режиме непрерывного возбуждения.

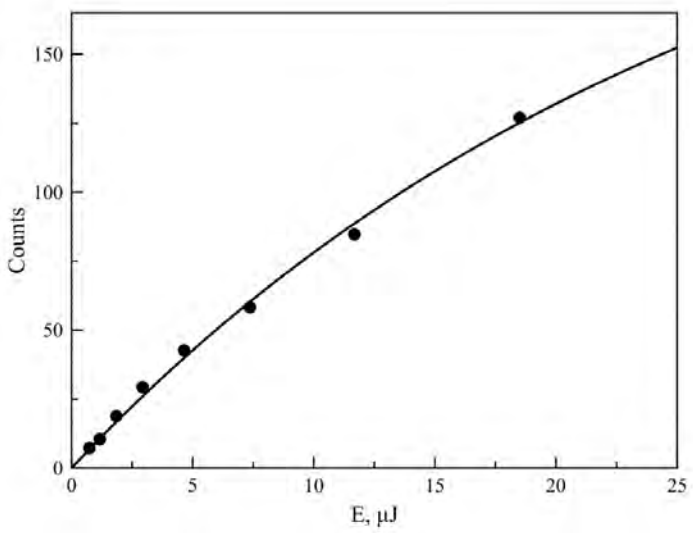


Рис. 6.1.12. Зависимость интегральной интенсивности флуоресценции кластеров Ag на 15-мерной ДНК от энергии импульса (λ_{em} = 580–620 нм), λ_{ex} 485 нм [56].

Для кластеров на 15-мерном ДНК-дуплексе, структура которого была рассмотрена в предыдущей главе, мы также определили коэффициент экстинкции кластера, используя тот же метод насыщения. Кривая насыщения флуоресценции показана на рис. 6.1.12. Апроксимация уравнением (4) дает значение коэффициента экстинкции $\varepsilon_{490}=(2.0\pm0.4)\cdot10^5$ $M^{-1}\cdot см^{-1}$.

6.2. Перенос энергии в комплексах ДНК с кластерами серебра.

В данной части работы решались задачи определения радиуса и скорости миграции энергии электронного возбуждения между основаниями ДНК и связанными с ней кластерами серебра. Радиус миграции определялся по отношению интенсивностей УФ полосы возбуждения с максимумом 260 нм и полосы возбуждения кластера в видимой области, как это делалось для молекул красителя в гл. 4. Скорость переноса возбуждения оценивалась по кинетике флуоресценции ДНК и акцептора в фемтосекундном временном диапазоне. На основе этих данных был сделан вывод об экситонном механизме переноса энергии в комплексах ДНК с нанокластерами серебра. Возможность делокализации энергии возбуждения (когерентный экситон) в системе

слабовзаимодействующих хромофоров показана ранее в наших работах на примере интеркалирующих молекул красителя акридинового оранжевого [88, 98].

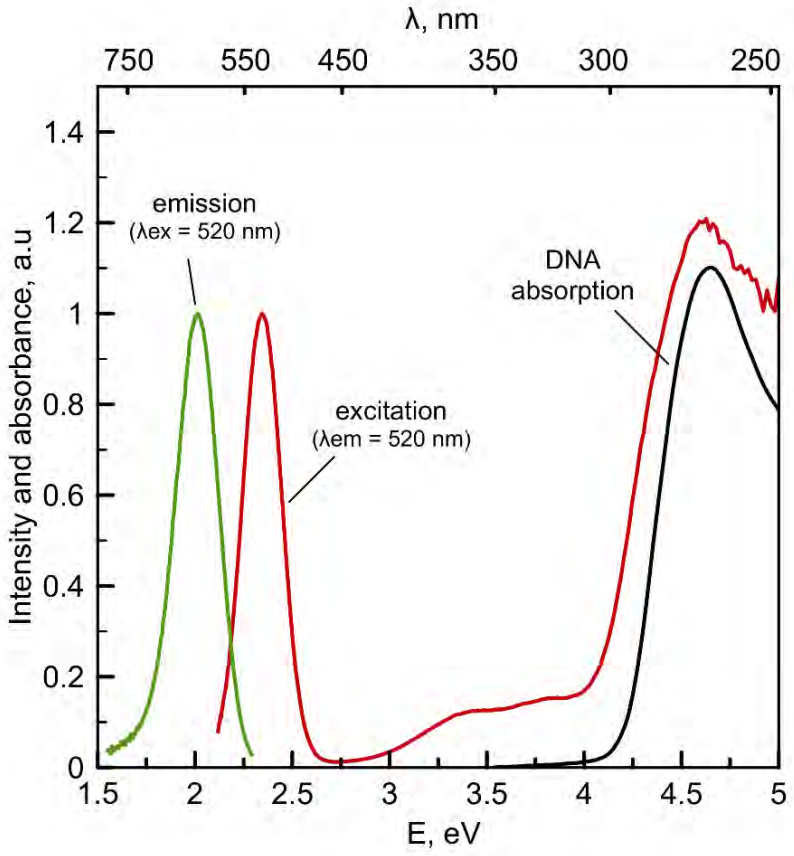


Рис. 6.2.1. Спектры флуоресценции и возбуждения флуоресценции Ag кластера на 12-мерной ДНК; спектр поглощения матрицы ДНК (спектр возбуждения комплекса и спектр поглощения матрицы ДНК отложены в одном масштабе с использованием известных коэффициентов экстинкции кластера [50] и 12-мерной ДНК [267].

На рис. 6.2.1 . показаны спектры флуоресценции и возбуждения кластеров на 12-мере ДНК 5'-CCTCCTTCCTCC-3 ’. Мы также нанесли на график спектр поглощения матрицы ДНК, используя коэффициенты экстинкции кластера, определенные в разделе 6.1, и ДНК, рассчитанные в олигокалькуляторе (программа для расчёта свойств олигонуклеотидов) [267]. Спектр возбуждения флуоресценции имеет два сильных перехода на 528 нм и 270 нм. Полоса с

максимумом 528 нм, очевидно, принадлежит самому нижнему по энергии переходу комплекса Ag-ДНК. Полоса возбуждения с максимумом 270 нм практически совпадает со спектром поглощения ДНК. Это означает, что около 12 оснований ДНК (все основания олигонуклеотида) передают энергию возбуждения кластеру. Эта величина, аналогична той, которая была оценена ранее для 23-мера ДНК [117].

Можно предположить, что число оснований, собирающих энергию возбуждения, N=12, может быть в значительной степени завышено из-за собственного поглощения кластера в УФ области. Если бы это было так, увеличение длины ДНК и / или длины двухцепочечной области должно иметь небольшое влияние на N. Чтобы проверить это, мы синтезировали флуоресцентные Ag кластеры с аналогичными спектральными и, следовательно, структурными свойствами на природной СТ ДНК и также на 15-мерном дуплексе [46, 53, 56]. Синтез ДНК-стабилизированных Ag кластеров обычно приводит к гетерогенному раствору, содержащему несколько видов наноструктур, большинство из которых представляют собой нелюминесцирующие комплексы Ag-ДНК и свободные от серебра нити ДНК [51, 132]. В некоторых случаях гомогенные растворы флуоресцентных комплексов Ag-ДНК с определенной кластерной ДНК-стехиометрией могут быть получены с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) [132]. Мы выполнили такую очистку для кластера на 15-мерной ДНК. Спектры поглощения, флуоресценции и возбуждения очищенного ВЭЖХ комплекса 15-мерной ДНК (5′-CGCCCCCCTCGGCGT-3′) и кластеров Ag, излучающих на 560 нм, представлены на рис. 6.2.2. Коэффициент поглощения кластера на 485 нм был получен непосредственно с использованием метода насыщения флуоресценции, описанный в предыдущем разделе 6.1. Было показано, что две цепи ДНК стабилизируют кластер (таким образом, стехиометрия кластер:ДНК = 1: 2) [132]. Спектр поглощения дуплекса ДНК с коэффициентом экстинкции, рассчитанным с помощью олигокалькулятора [267] также представлен на рисунке 6.2.2.

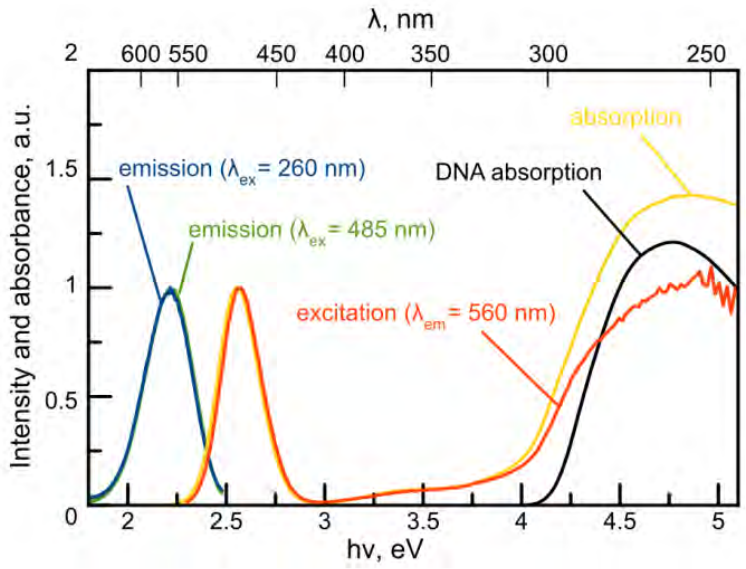


Рис. 6.2.2. Спектры флуоресценции (синий и зеленый), возбуждения (красный) и поглощения (желтый) очищенного ВЭЖХ комплекса Ag-15-мер ДНК (5'-CGCCCCCCTCGGCGT-3 '); спектр поглощения дуплекса ДНК - черный. Спектры возбуждения и поглощения комплекса Ag-ДНК нормированы на единицу в максимуме в видимой области. Спектр поглощения ДНК представлен как отношение коэффициента экстинкции ДНК к коэффициенту экстинкции кластера в максимуме в видимой области [56].

Как видно из рисунка, УФ-полоса комплекса в районе 260 нм принадлежит в основном ДНК, тогда как полоса с максимумом на 485 нм, очевидно, является самым низким по энергии переходом кластера Ag. Ультрафиолетовая полоса, наблюдаемая в спектре возбуждения комплекса, как и в других комплексах Ag–ДНК, очевидно, связана с переносом энергии между ДНК и кластером. Спектр возбуждения приближается к спектру поглощения, что указывает на то, что эффективность переноса энергии близка к единице.

Количественно эффективность переноса φ можно оценить по спектрам, показанным на рисунке 6.2.2, следующим образом (см. гл. 4):

$$\varphi = 1 - \frac{A(\lambda) - I(\lambda)}{A_{DNA}(\lambda)} \qquad (1).$$

В этом уравнении спектры поглощения *A(λ)* и возбуждения флуоресценции *I(λ)* комплекса Ag–ДНК нормированы на единицу в максимуме в видимой части спектра. Спектр поглощения ДНК $A_{DNA}(\lambda)$ рассчитывается как отношение коэффициента экстинкции ДНК ($\varepsilon_{DNA}(\lambda)$) к коэффициенту экстинкции кластера в видимом максимуме (ε_{Ag}^{max}). Из полученных спектральных данных мы получаем эффективность переноса φ = 0,70 ± 0,05, что означает, что 21 ± 2 основания ДНК (из 30 в комплексе) передают энергию кластеру со 100% эффективностью. Иначе, это может быть интерпретировано, как если бы весь дуплекс ДНК был в качестве антенны, передающей энергию с эффективностью 70%. В нашей простой модели мы пренебрегли взаимодействием оснований и кластера, которое может влиять на коэффициент экстинкции ДНК. Однако, учитывая небольшой размер кластера по сравнению с длиной ДНК (как показано ниже), мы не ожидаем, что он качественно изменит эффект. Детальное исследование электронных состояний комплекса Ag–ДНК потребовало бы сложных QM расчетов.

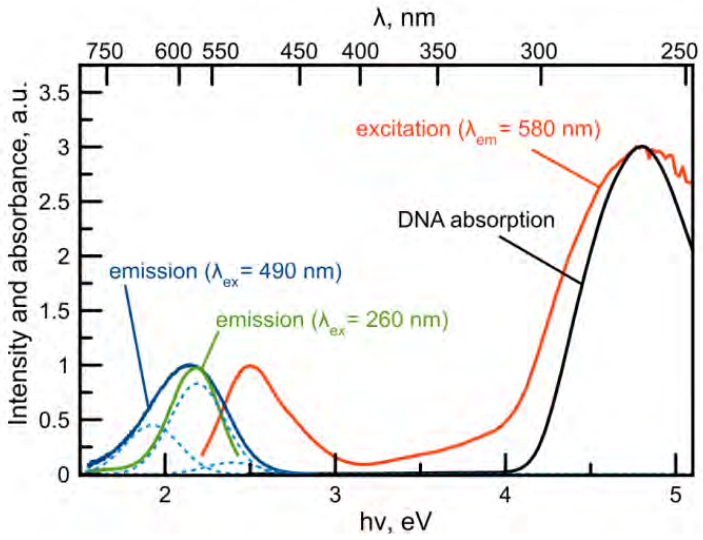


Рис. 6.2.3. Спектры испускания (синий и зеленый) и возбуждения (красный) флуоресценции кластеров Ag, связанных с СТ ДНК; спектр поглощения матрицы ДНК (масштабируется по максимуму полосы УФ-возбуждения) - черный. Спектр испускания комплекса, возбуждаемого на 260 нм (синий), был разделен на три гауссиана (штрих) [56].

Чтобы оценить возможную длину светособирающей области в природной ДНК, мы синтезировали флуоресцентные кластеры на СТ ДНК и применили аналогичную методику для определения количества оснований, передающих энергию кластерам. Как правило, в двуспиральной ДНК выход люминесцирующих кластеров мал [46, 152]. Поэтому нативная СТ ДНК сначала подвергалась термической денатурации, что к тому же позволило нам получить более гомогенный раствор флуоресцирующих кластеров. Спектры флуоресценции и возбуждения кластеров Ag на матрице СТ ДНК показаны на рисунке 6.2.3.

Спектр излучения комплекса ДНК-кластер имеет полосу излучения около 580 нм при возбуждении 260 нм и 490 нм. Спектр излучения, при возбуждении в полосе ДНК, также показывает небольшое присутствие двух других кластеров в синей и красной областях, которые доминировали на более ранней и поздней стадиях синтеза соответственно (спектр, возбуждаемый на 260 нм, разделен на три полосы, как показано на рис. 6.2.3). Полоса возбуждения флуоресценции с максимумом 260 нм практически совпадает со спектром поглощения ДНК, что свидетельствует о том, что имеет место передача энергии от оснований ДНК на кластер. Как и в случае Ag кластера на 15-мерной ДНК, собственное поглощение кластера при 260 нм, вероятно, является незначительным по сравнению с поглощением оснований ДНК, выступающих в роли сенсибилизатора люминесценции кластера. Если это так, то количество оснований ДНК, передающих энергию *N*, можно оценить по соотношению интенсивности УФ и видимой полосы в спектре возбуждения флуоресценции кластера с использованием следующего уравнения (см. гл. 4):

$$N = \frac{I(260)\cdot f\cdot \varepsilon_{Ag}^{max}}{\varepsilon_{DNA\,b.}(260)\cdot \varphi} \qquad (2),$$

где *I(260)* обозначает интенсивность при 260 нм в спектре возбуждения, нормированную на 1 в видимом максимуме, f – вклад кластера в интенсивность в

максимуме излучения на 490 нм, , $\varepsilon_{DNA\,b.}(260)$ - коэффициент экстинкции оснований ДНК на 260 нм, а φ - эффективность переноса.

Мы нашли значение $\varepsilon_{Ag}^{max} = (1.0 \pm 0.1) \cdot 10^5$ M^{-1} $см^{-1}$ на 490 нм в предыдущем разделе. Принимая типичное значение $\varepsilon_{DNA\,b.}(260) = 6.6 \cdot 10^3$ M^{-1} $см^{-1}$ для СТ ДНК, f = 0,8, полученное из разложения спектра на три гаусса (рис. 6.2.3), и исходя из 100% эффективности переноса, мы получили N = 35 ± 3 основания. Эта величина, вероятно, слегка завышена из-за вклада собственного поглощения кластера в спектр возбуждения комплекса. Если этот вклад, как и в случае 15-мерной ДНК, составляет около 20%, он уменьшает N до 28 оснований. Также стоит отметить, что если эффективность переноса составляет менее 100%, значение N будет даже больше.

Чтобы прояснить механизм переноса энергии в комплексах ДНК-кластер, мы оценили возможную скорость переноса энергии, выполнив серию измерений кинетики флуоресценции. Сначала мы измерили время жизни флуоресценции свободных СТ ДНК и 15-мерного олигонуклеотида, использованного для синтеза флуоресцентных комплексов Ag-ДНК. Кривая затухания флуоресценции 15-мерной ДНК на 325 нм временном диапазоне 5 пс показана на рис. 6.2.4. Аппроксимация двумя экспонентами дает основную компоненту времени жизни флуоресценции 380 фс. Возбужденное состояние основной фракции СТ ДНК дезактивируется за время 490 фс (рис. 6.2.5). Низкая концентрация флуоресцентных комплексов Ag-ДНК в растворе и сильное фотовыцветание кластеров затрудняют непосредственное измерение скорости передачи энергии в случае зеленого кластера на 15-мере. Однако возможную скорость переноса можно оценить по времени жизни флуоресценции ДНК. Высокая эффективность переноса энергии между донором и акцептором подразумевает относительно высокую скорость переноса по сравнению с временем жизни донора в возбужденном состоянии. Эффективность передачи энергии определяется как [168]:

$$\varphi = \frac{k_{ET}}{k_{ET}+k} \quad (3),$$

где k_{ET} - скорость передачи энергии, а k - собственная скорость дезактивации донора.

При данной скорости дезактивации ДНК (380 фс)$^{-1}$ и φ = 0,7 для 15-мерной ДНК следует, что перенос должен происходить в течение <160 фс.

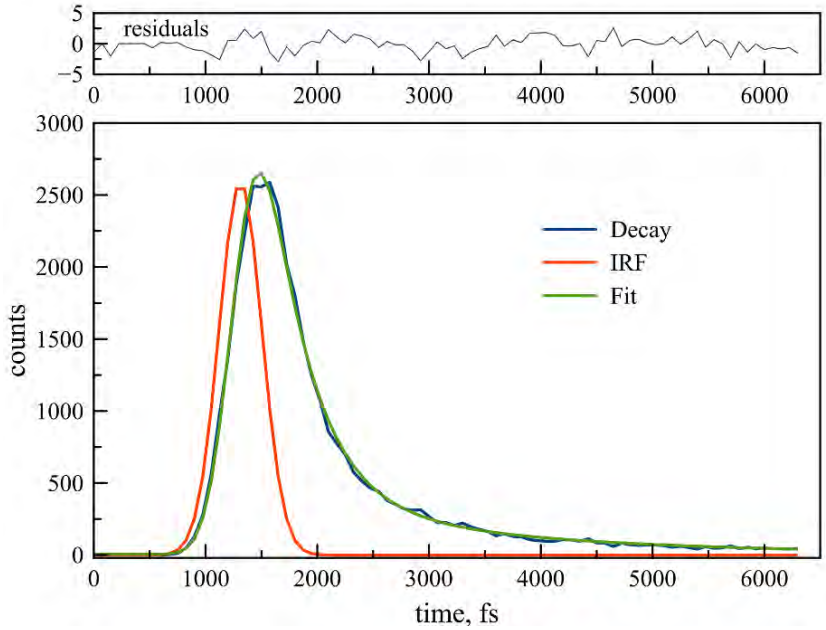


Рис. 6.2.4. Кривая затухания флуоресценции ДНК 5’-CGCCCCCCTCGGCGT-3’на 325 нм (λex = 266 нм); аппроксимация: 0,91exp (-t / 380 fs) + 0,09exp (-t / 2 ps) [56].

Скорость передачи энергии от ДНК к кластеру может быть непосредственно измерена как время нарастания флуоресценции кластера при возбуждении ДНК. На рис. 6.2.6 показана кривая нарастания флуоресценции кластера на СТ ДНК с возбуждением 266 нм (в пределах полосы поглощения ДНК). Исходя из времени разрешения установки ~100 фс, можно утверждать, что передача энергии действительно происходит за время меньшее чем 100 фс.

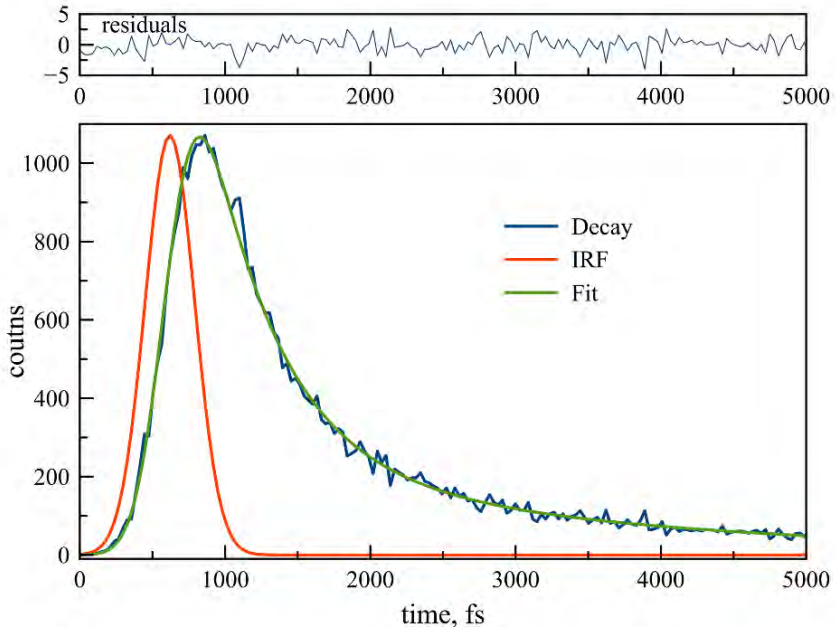


Рис. 6.2.5. Кривая затухания флуоресценции односпиральной (ss) СТ ДНК на 330 нм (λex = 266 нм); аппроксимация: 0,85exp (-t / 490 fs) + 0,15exp (-t / 2,6 пс) [56].

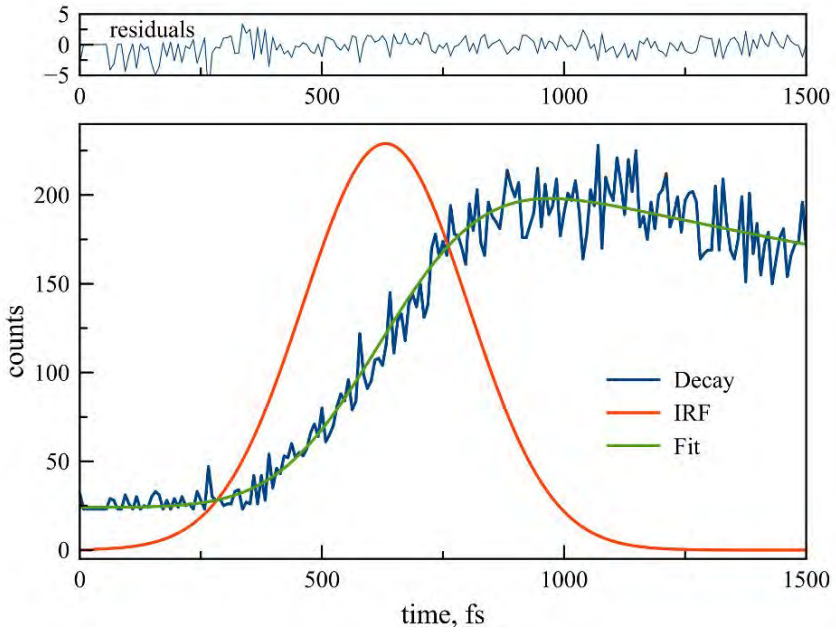


Рис. 6.2.6. Кинетика флуоресценции кластеров на СТ ДНК на 590 нм (λex = 266 нм); аппроксимация: exp(--t / 3 пс) [56].

Для выводов о возможном механизме переноса энергии в изученных системах необходимо знать расстояние между донором и акцептором. Для этого обратимся к структурам комплексов, которые были получены в предыдущей главе. В комплексе 12-мер ДНК-Ag, кластер Ag_4^{+2} стабилизируется двумя некомплиментарными парами C-C и одной T-T в основании шпильки ДНК. Структура комплекса показана на рис. 6.2.7. Кластеры на 12-мерной ДНК и CT ДНК имеют сходные спектры возбуждения / эмиссии и одинаковые сечения поглощения. Это говорит о сходной структуре флуоресцентных комплексов Ag-ДНК.

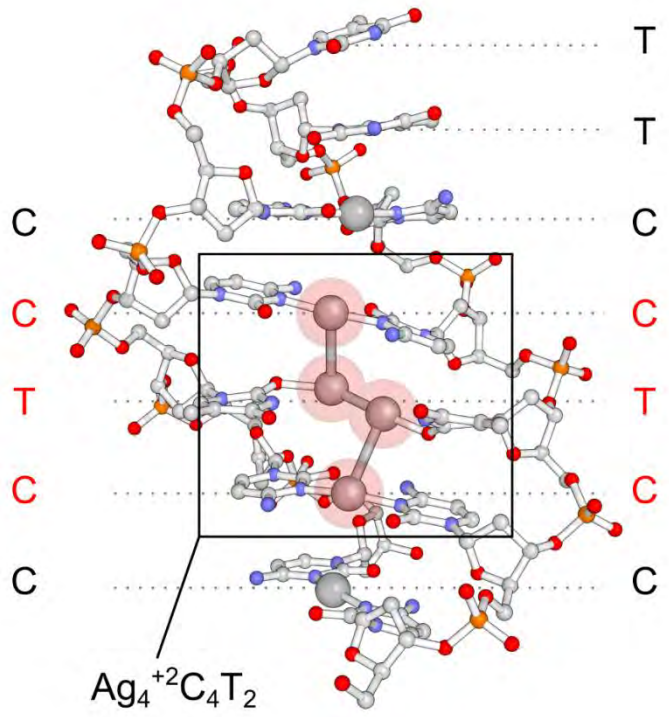


Рис. 6.2.7. Структура флуоресцентного комплекса кластера Ag_4^{+2} на 12-мерном олигонуклеотиде 5’-CCTCCTTCCTCC-3’ [56].

Структура кластера на 15-мерном дуплексе была рассмотрена в гл. 5. Хромофорный центр комплекса состоит из 6 атомов серебра, вытянутых в зигзагообразную линию и стабилизированных двумя нитями ДНК (рис.6.2.8). Кластер имеет заряд +2.

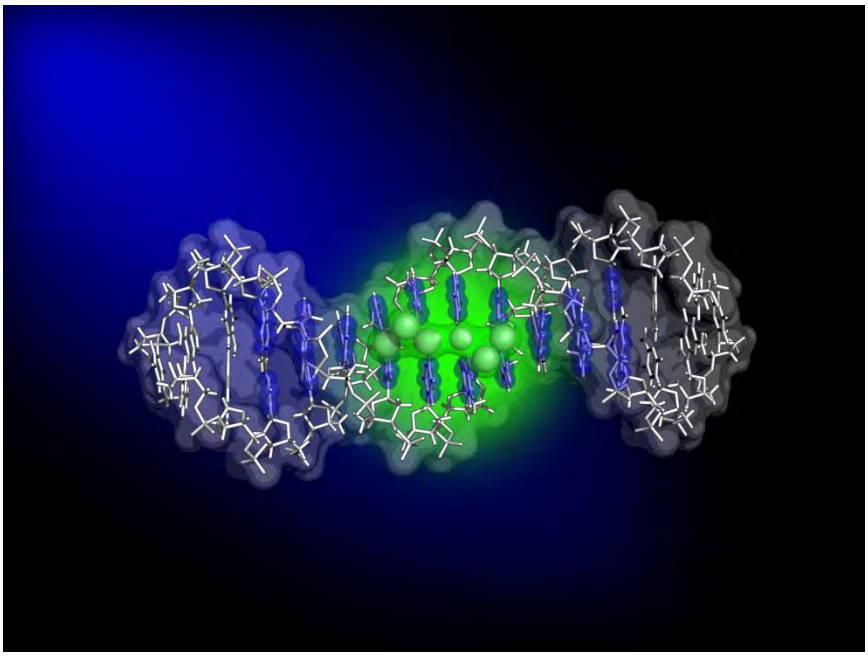


Рис. 6.2.8. Структура кластера Ag_6^{+2} на 15-мерном дуплексе [56].

Число оснований, собирающих энергию возбуждения в комплексах Ag кластеров с СТ ДНК и 15-мерным ДНК-дуплексом, оказывается в 5–7 раз больше типичных значений, наблюдаемых для систем ДНК-акцептор [12, 112, 241, 115, 116] и в три раза больше, чем предполагалось ранее для 23-мерной [117] шпильки с примерно 10 основаниями в двуспиральном участке. Кластеры связываются с 6–8 основаниями ДНК в двухцепочечных областях (рис. 6.2.7 и 6.2.8). Возбужденные состояния комплексов, как показано в предыдущей главе, включают в себя орбитали атомов Ag и оснований ДНК. Фактически, «кластер» представляет собой металлоорганический комплекс с возбужденными состояниями, затрагивающими 6-8 оснований ДНК и 4-6 атомов серебра (Ag_4B_6 или Ag_6B_8). Таким образом, можно ожидать перенос энергии с 6-8 оснований ДНК в хромофорных центрах Ag_4B_6 и Ag_6B_8. Однако в относительно длинных двухцепочечных областях (как в СТ ДНК или 15-мерном дуплексе) в переносе энергии участвуют 21–28 оснований в качестве доноров, большинство из которых отдалены от кластера. Следовательно, перенос энергии по спирали ДНК вносит

значительный вклад в процесс переноса энергии. Высокая скорость передачи $\gtrsim$ (100 фс) $^{-1}$ на расстоянии около 25 Å (половина длины 15-мерного дуплекса), очевидно, несовместима с тривиальным некогерентным механизмом Фёрстера. Такой сверхбыстрый (и, следовательно, высокоэффективный) перенос энергии требует делокализации возбуждения между основаниями ДНК, не связанными с атомами Ag, и, по меньшей мере, одним основанием, связанным с кластером. В этом случае возбужденные состояния системы $|k\rangle$ являются смешанными состояниями и могут быть записаны как сумма возбужденных состояний нуклеиновых оснований ($\Psi_{k,i}$) и акцептора (Ψ_A):

$$|k\rangle = \sum C_{k,i}\Psi_{k,i} + C_A\Psi_A \qquad (4).$$

Степень делокализации возбуждения, т. е. число когерентно связанных хромофоров, обычно определяется количественно с помощью обратного коэффициента участия [269] *IPR=1/L*$_k$:

$$L_{k=} \sum_i \left[\sum_m (C_{k,i}^m)^2\right]^2 \qquad (5),$$

где *m* представляет различные электронные состояния хромофора *i*.

Теоретические расчеты с учетом конформационного беспорядка в полинуклеотидах предсказывали значение *IPR* 6-8 оснований [69, 270]. Расчеты сложной динамики системы взаимодействующих хромофоров должны учитывать энергетический и конформационный беспорядок и все соответствующие вибронные состояния, включая взаимодействия системы с термостатом. Различные теоретические подходы к динамике возбуждения можно найти в литературе [2, 59, 61-64].

В нашем случае наиболее вероятно, что возбуждение делокализовано по основаниям ДНК в одной цепи. Тогда, чтобы собрать энергию возбуждения с оснований ДНК, не связанных с кластером, минимальный необходимый размер

экситона (M) в каждом из четырех одноцепочечных сегментов ДНК, смежных с кластером, можно оценить как:

$$M = \frac{N-n}{4} + 1 \qquad (6),$$

где N обозначает количество оснований, передающих энергию, а n количество оснований, связанных с кластерами Ag. В случае 15-мерного дуплекса ДНК N = 21 и n = 8. M, таким образом, составляет четыре основания. Для СТ ДНК N = 28 и n = 6, а M составляет около семи оснований. Данный случай схематически показан на рис. 6.2.9.

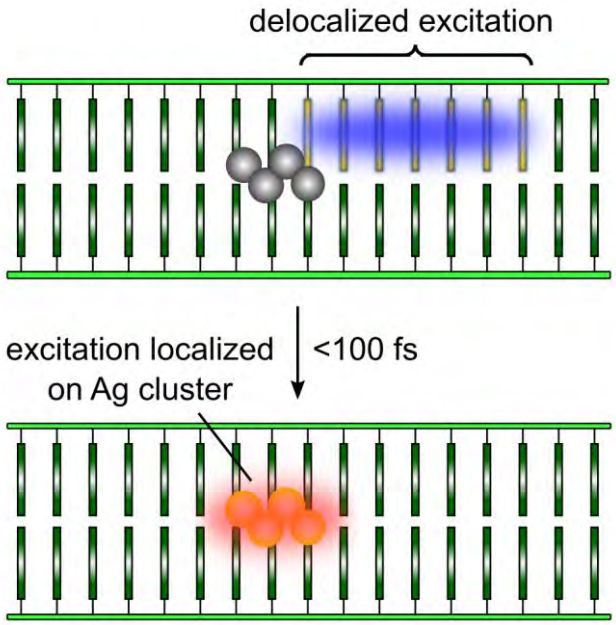


Рис. 6.2.9. Процесс передачи возбуждения между основаниями ДНК и люминесцирующим Ag кластером, связанным с ДНК дуплексом. Вертикальные столбцы обозначают основания ДНК в дуплексе, серые кружки представляют кластер, связанный с шестью основаниями, синяя овальная область показывает пространственную протяженность экситона, а красная овальная область иллюстрирует локализацию возбуждения на кластере [56].

Оба случая значительно отличаются от комплекса с АО, который не указывает на какую-либо делокализацию между основаниями, что показано в гл. 4. Конечно, локальная структура ДНК, а также нуклеотидный состав могут отличаться в этих случаях. Экспериментально делокализация возбуждения может проявляться во время-разрешенных спектрах поглощения во временной области, меньшей времени локализации экситонов. Усиление выцветания основного состояния за счет делокализации экситонов наблюдалось в фотосинтетических антеннах [86, 87], а также в комплексах краситель-ДНК, изученных нами ранее [88, 98]. Между тем, не наблюдалось усиление выцветания во временных спектрах поглощения для полимерных компонентов ДНК по сравнению с мономерами. Временное разрешение в этих экспериментах составляло порядка 100 фс [72, 73]. Это может указывать на то, что локализация экситонов происходит быстрее 100 фс. В этом отношении необходимы эксперименты с временным разрешением 10 фс в глубоком УФ-диапазоне, что является на данный момент весьма сложной технической задачей.

6.3. Динамика флуоресцентного возбужденного состояния комплекса Ag-DNA.

В этой части мы исследуем динамику спектра люминесценции комплекса Ag-ДНК на фемтосекундной временной шкале, используя метод ап-конверсии флуоресценции. Мы показываем, что основная часть релаксации из состояния Франка – Кондона в люминесцентное состояние происходит менее чем за 100 фс. Палитра ДНК-стабилизированных Ag нанокластеров представляет собой спектрально перестраиваемые, фотостабильные и яркие флуорофоры с большими стоксовыми сдвигами. Такие излучатели имеют идеальные характеристики в микроскопических приложениях, где фоновое излучение и рассеяние являются серьезной проблемой. Как правило, кластеры имеют относительно большой Стоксов сдвиг, разницу между максимумами поглощения и излучения. Например, кластер Ag-ДНК, излучающий в ближнем ИК-диапазоне, показал сдвиг 5600 $см^{-1}$

[159]. Большой Стоксов сдвиг является типичным проявлением существенной структурной перестройки и / или релаксации растворителя в возбужденном состоянии. Как быстро происходит эта релаксация? Динамический стоксов сдвиг кластеров Ag-ДНК, наблюдаемый в экспериментах с временным наносекундным разрешением [159-163], не превышал 200 $см^{-1}$ в водном растворе, что означает, что основная релаксация происходит в пикосекундном и / или фемтосекундном масштабе времени. Выяснение механизмов ранней динамики эмиссии после фотовозбуждения в кластерах необходимо для дальнейшей разработки этих систем для приложений, в которых требуется минимизация безызлучательных процессов для увеличения квантового выхода флуоресценции и увеличения стоксового сдвига. Однако динамика эмиссии кластеров Ag в фемтосекундном масштабе времени практически не изучалась. Первые эксперименты с временным разрешением на фемтосекундной шкале для кластеров Ag-ДНК были выполнены Диксоном с соавт. [164]. На основании экспериментов «накачка-зонд» они предложили энергетическую диаграмму с четырьмя состояниями для кластера, излучающего в красном спектральном диапазоне. Люминесцентное состояние кластера формируется за 350 фс. Тирхаг с соавт. в недавней работе [165] наблюдали сверхбыструю ~ 100 фс релаксацию возбужденного состояния NIR-излучающего кластера Ag-ДНК со Стоксовым сдвигом 1000 $см^{-1}$. Ведут ли себя другие Ag кластеры с большим Стоксовым сдвигом таким же образом?

Отвечая на этот вопрос, мы исследовали динамику эмиссии комплекса Ag-ДНК методом ап-конверсии флуоресценции. Мы синтезировали кластер, излучающий на 525 нм и поглощающий на 400 нм (вторая гармоника лазера) на 15-мерной ДНК 5'-CGCCCCCCTCGGCGT-3 '. Эта последовательность ДНК была использована для синтеза кластера Ag с максимумами возбуждения / эмиссии 480/560 нм (см. 6.2). Мы изменили условия синтеза так, чтобы получить кластер, поглощающий около 400 нм.

Спектры поглощения, флуоресценции и возбуждения флуоресценции кластера показаны на рис. 6.3.1 [57]. Кластер имеет максимумы возбуждения и испускания 425 нм и 525 нм соответственно. Спектр возбуждения близок к спектру

поглощения, что означает, что в растворе присутствует в основном один тип молекул [271]. Некоторое различие между спектрами возбуждения и поглощения в коротковолновой области может быть связано с наличием темнового неизлучающего кластера и / или с рассеянием света образцом. К сожалению, образец оказался нестабильным во время процедуры очистки ВЭЖХ.

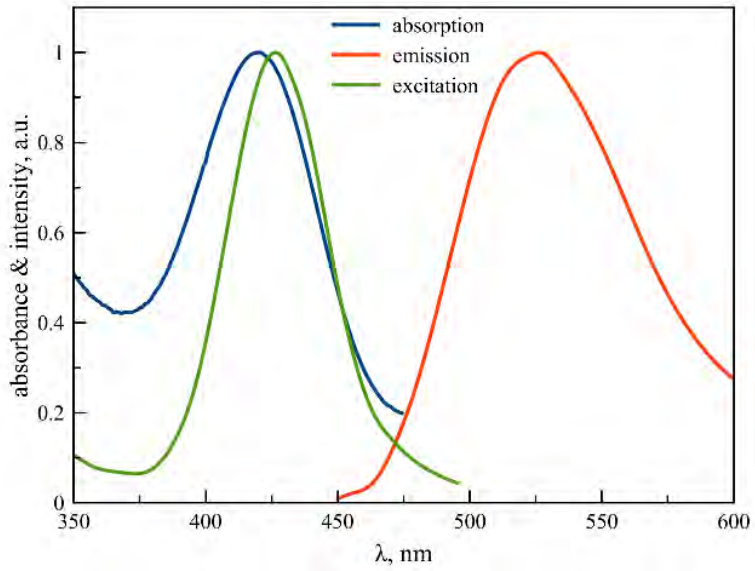


Рис. 6.3.1. Спектры поглощения, флуоресценции и возбуждения кластера Ag-ДНК (λex 400 нм, λem 530 нм) [57].

Кластер Ag-ДНК имеет относительно большой Стоксов сдвиг 4500 $см^{-1}$. Большой сдвиг полезен для спектрального разделения возбуждения и излучения света в микроскопических приложениях. Понимание природы стоксова сдвига в кластерах является необходимым условием для разработки новых кластеров с желаемыми свойствами. Обычно стоксов сдвиг возникает из-за структурной релаксации в возбужденном состоянии. Большой Стоксов сдвиг подразумевает существенную разницу между равновесной геометрией основного и возбужденного состояний. Релаксация включает в себя изменения как структуры хромофора (то есть структуры металлического ядра кластера), так и реорганизации окружающей среды (то есть растворителя / ДНК) в возбужденном состоянии [271]. Поскольку скорости этих процессов различны, их можно различить с помощью флуоресцентной спектроскопии с временным разрешением.

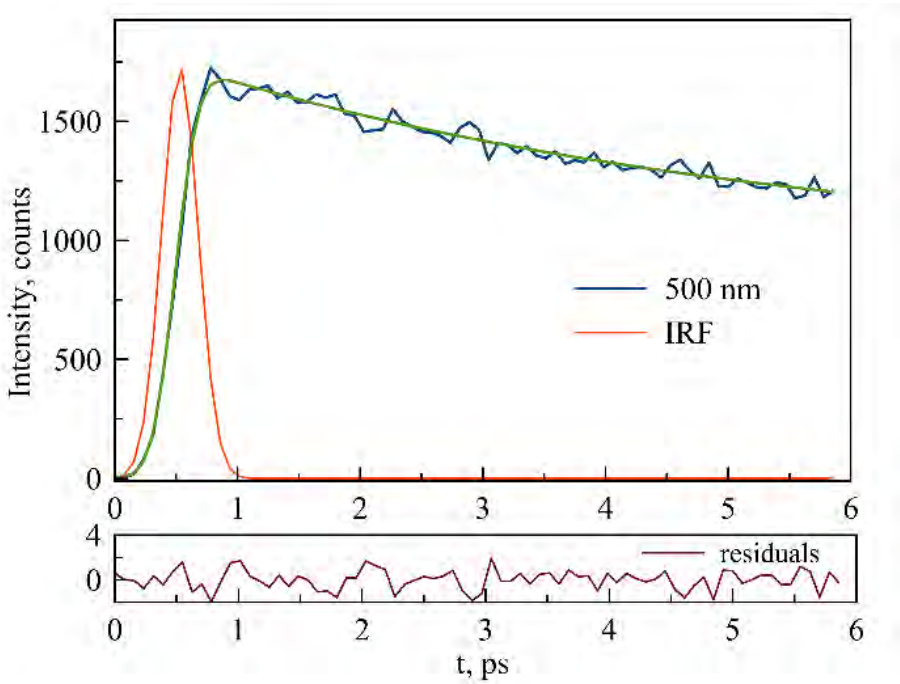


Рис 6.3.2. Кривая затухания флуоресценции Ag-ДНК на 500 нм; аппроксимация: (0,4 ± 0,1) exp (-t / 5 ± 2) + (0,6 ± 0,1) exp (-t / 120) [57].

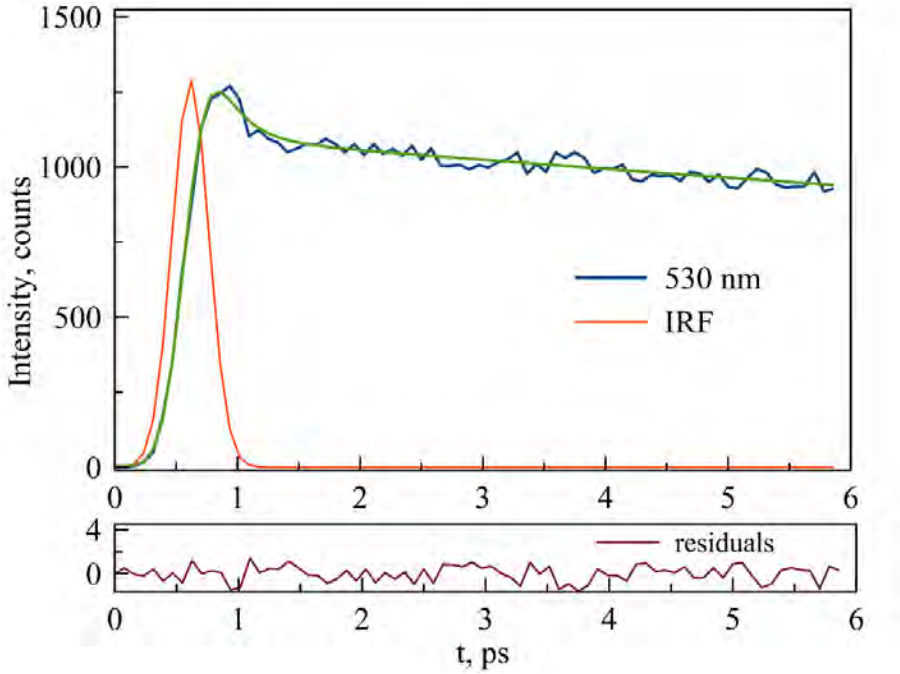


Рис. 6.3.3. Кривая затухания флуоресценции Ag-ДНК на 530 нм; аппроксимация: (0.33±0.03)exp(-t/0.20±0.05) +(0.67±0.03)exp(-t/33±5) [57].

Кривые затухания флуоресценции показаны на рис. 6.3.2-6.3.3. Сигнал возрастает за время меньшее доступного временного разрешения прибора, <100

фс. Спектр флуоресценции, зарегистрированный в нулевой момент времени, имеет максимум 510 нм (рис. 6.3.4). Это означает, что бóльшая часть (> 80%) релаксации из состояния Франка – Кондона в излучающее состояние происходит быстрее, чем за 100 фс.

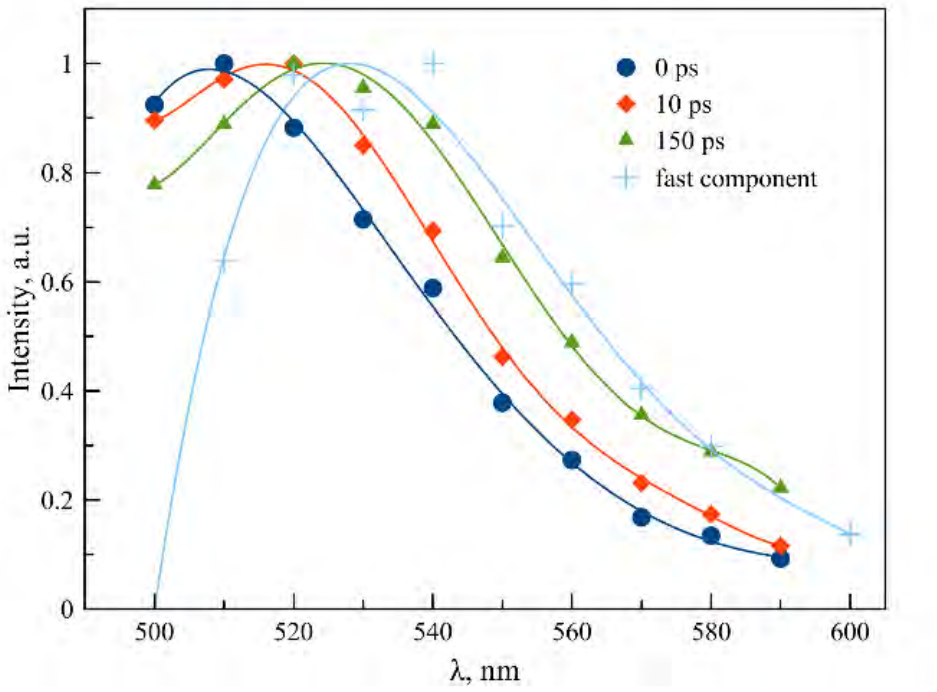


Рис 6.3.4. Разрешенные во времени спектры флуоресценции кластера Ag-ДНК; спектр быстрой компоненты (см. текст) [57].

Дальнейшая небольшая релаксация происходит с постоянными времени от нескольких до сотен пикосекунд. Спектр флуоресценции сдвигается примерно на 300 $см^{-1}$ в красную сторону в первые 10 пс после начальной быстрой релаксации (рис. 6.3.4). Гораздо более медленная релаксация происходит дальше в течение времени жизни флуоресценции. Спектр смещается еще на 300 $см^{-1}$ за 0,15 нс. Ранее аналогичные динамические Стоксовы сдвиги наблюдались для кластеров Ag-ДНК в наносекундном масштабе времени [160-165]. Эти значения, однако, намного меньше, чем Стоксовы сдвиги, измеренные между максимумами стационарного спектра поглощения и излучения кластеров. Небольшой динамический Стоксов сдвиг, наблюдаемый в комплексе Ag-ДНК на

пикосекундной шкале времени, указывает на незначительную реорганизацию растворителя / матрицы в возбужденном состоянии. Отсутствие значительной диэлектрической перестройки в возбужденном состоянии позволяет предположить, что дипольный момент комплекса Ag-ДНК существенно не изменяется при возбуждении. Поскольку большая часть релаксации в комплексе Ag-ДНК происходит быстрее 100 фс, гораздо быстрее, чем релаксация растворителя, можно сделать вывод, что Стоксов сдвиг возникает в основном из-за изменения структуры кластера в возбужденном состоянии, а не в результате реорганизация растворителя или матрицы ДНК.

Интересная особенность наблюдается на кривых затухания на длинах волн более 500 нм. Появляется быстрая компонента с временем затухания около 200 фс (рис. 6.3.3). Ее спектр (рис. 6.3.4) несколько смещен в красную сторону относительно разрешенных во времени и стационарных спектров кластера. Время затухания 200 фс, однако, не предполагает никакого вклада в стационарный спектр излучения. Эту быструю компоненту можно рассматривать как проявление нелюминесцирующей структуры комплекса Ag-ДНК («темновй» кластер).

6.4. Выводы к главе 6.

Методом флуоресцентной спектроскопии насыщения можно определить основные фотофизические константы люминесцирующих комплексов Ag-ДНК в относительно гетерогенных растворах. Мы показали для двух типов кластеров, что образование темновых состояний является достаточно эффективным процессом и происходит на наносекундной временной шкале.

В комплексах ДНК с кластерами серебра обнаружена эффективная миграция энергии с участка, насчитывающего до 30 оснований. Перенос энергии происходит за время быстрее 100 фс. Перенос энергии по спирали ДНК вносит значительный вклад в процесс переноса энергии. Такой сверхбыстрый высокоэффективный перенос энергии требует делокализации возбуждения между

основаниями ДНК, не связанными с атомами Ag. Размер области делокализации может составлять 4-7 оснований в цепочке.

В динамике спектра флуоресценции кластера Ag-ДНК наблюдаются несколько путей релаксации с различными характерными временами. Большая часть релаксации из состояния Франка–Кондона в люминесцентное состояние происходит за 100 фс, несмотря на относительно большой стоксов сдвиг 4500 $см^{-1}$. Поскольку релаксация в комплексе Ag-ДНК происходит намного быстрее, чем обычные скорости релаксации растворителя и ДНК, можно сделать вывод, что стоксов сдвиг возникает в основном из-за изменения геометрии кластера в возбужденном состоянии, а не из-за релаксации растворителя или реорганизации ДНК.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В заключении необходимо отметить возможные направления развития данной темы. Развитие приборной базы лазерной временной спектроскопии с разрешением порядка 10 фс в области УФ полосы поглощения ДНК в последние годы создает хорошие предпосылки для исследования первичных фотопроцессов в ДНК с разрешением в несколько фемтосекунд. Такие исследования могли бы ответить на фундаментальные вопросы, касающиеся когерентных эффектов, делокализации возбуждения, скорости образования эксиплексов и быстрых фотохимических реакций в ДНК и наноконструкций на основе ДНК, а также зависимости этих процессов от локальной структуры ДНК. В связи с развитием нанотехнологий на основе ДНК, в частности изучения самоорганизации и образования наноструктур ДНК с участием ионов и кластеров металлов, необходимо развивать исследование фотопроцессов в этих системах. Появляющиеся работы по синтезу кристаллических структур комплексов ионов и кластеров серебра открывают перспективу для детального изучения взаимосвязи структуры и фотофизики комплексов, а также отработки методов их теоретического моделирования. Такие исследования необходимы для целенаправленного синтеза комплексов с заданными свойствами для их дальнейшего практического применения.

БЛАГОДАРНОСТИ

Я признателен всем моим коллегам, с которыми я работал над этой тематикой. Я также хочу поблагодарить всех, кто помогал мне в работе. Я благодарен проф. Нине Анатольевне Касьяненко и проф. Вере Константиновне Адамчук (она скончалась в 2016 г.), поддержавшим меня в трудные времена. Я помню и благодарен своему первому научному руководителю проф. Виктору Львовичу Рапопорту, а также с.н.с. Владимиру Михайловичу Бакулеву, который был научным руководителем моей кандидатской диссертации.

ЛИТЕРАТУРА

1. Arndt, M. Quantum physics meets biology / M. Arndt, T. Juffmann, V. Vedral, // HFSP Journal. – 2009. – Vol. 3 (6). – P. 386–400.

2. Fassioli, F. Photosynthetic light harvesting: excitons and coherence / F. Fassioli [et al.] // J. R. Soc. Interface. – 2014. – Vol. 11. – P. 20130901.

3. Sagan, C. Ultraviolet selection pressure on the earliest organisms / C. Sagan // J. Theor. Biol. – 1973. – Vol. 39. – P. 195–200.

4. Skulachev, V. Bioenergetics: the evolution of molecular mechanisms and the development of bioenergetic concepts / V. Skulachev // Antonie van Leeuwenhoek. – 1994. – Vol. 65. – P. 271–284.

5. Bush, C. A. Ultraviolet spectroscopy, circular dichroism, and optical rotatory dispersion / C. A. Bush // Basic Principles in Nucleic Acid Chemistry. Vol. 2 / Ed. O. P. Paul. – Ts'O, Academic Press, New York, 1974. – P. 91–169.

6. Kasha, M. Energy transfer mechanisms and the molecular exciton model for molecular aggregates/ M. Kasha // Radiat. Res. – 1963. – Vol. 20. – P. 55–70.

7. Davydov, A. S. Theory of molecular excitons / A. S. Davydov. – McGraw–Hill, 1962.

8. Long–Range Charge Transfer in DNA. Vols. I and II / Ed. G. B. Schuster. – Springer Berlin Heidelberg, 2004.

9. Slinker, J. D. DNA charge transport over 34 nm / J. D. Slinker [et al.] // Nat Chem. – 2011. – Vol. 3. – P. 228–233.

10. Livshits, G. I. Long–range charge transport in single G–quadruplex DNA molecules / G. I. Livshits [et al.] // Nat Nano advance online publication. – 2014. – Vol. 9 (12). – P. 1040.

11. Guéron, M. Excited states of nucleic acids / M. Guéron, J. Eisinger, A. A. Lamola // Basic Principles in Nucleic Acid Chemistry. Vol. 1 / Ed. O. P. Paul. – Ts'O, Academic Press, New York, 1974. – P. 311–398.

12. Nordlund, T. M. Sequence, structure and energy transfer in DNA / T. M. Nordlund // Photochem. Photobiol. – 2007. – Vol. 83. – P. 625–636.

13. Middleton, C. T. DNA Excited–state dynamics: from single bases to the double helix / C. T. Middleton [et al.] // Annu. Rev. Phys. Chem. – 2009. – Vol. 60. – P. 217–239.

14. Cadet, J. Photoinduced damage to cellular DNA: direct and photosensitized reactions / J. Cadet [et al.] // Photochem. Photobiol. – 2012. – Vol. 88. – P. 1048–1065.

15. Wurtmann E. J, RNA under attack: cellular handling of RNA damage / E. J. Wurtmann, S. L. Wolin // Critical reviews in biochemistry and molecular biology. – 2009. – Vol. 44 (1). – P. 34–49.

16. De Gruijl, F. R. Skin cancer and solar UV radiation / F. R. de Gruijl // Eur. J. Cancer. – 1999. – Vol. 35. – P. 2003–2009.

17. Pfeifer, G. P. Mutations induced by ultraviolet light / G. P. Pfeifer, Y.–H. You, A. Besaratinia // Mutat. Res., Fundam. Mol. Mech. Mutagen. – 2005. – Vol. 571. – P. 19–31.

18. Brash, D. E. UV–induced mutation hotspots occur at DNA damage hotspots / D. E. Brash, W. A. Haseltine // Nature. – 1982. – Vol. 298. – P. 189–192.

19. Baverstock, K. F. Solitons and energy transfer in DNA / K. F. Baverstock // Nature. – 1988. – Vol. 332. – P. 312–313.

20. Sutherland, J. C. Absorption spectrum of DNA for wavelengths greater than 300 nm / J. C. Sutherland, K. P. Griffin // Radiation research. – 1981. – Vol. 86 (3). – P. 399–410.

21. ASTM G173–073 standard tables of reference solar spectral irradiances: Terrestrial Global 37 deg South Facing Tilt [Electronic resource] // The National Renewable Energy Laboratory. – Mode of access: https://www.nrel.gov/grid/solar-resource/spectra.html.

22. Besaratinia, A. Wavelength dependence of ultraviolet radiation–induced DNA damage as determined by laser irradiation suggests that cyclobutane pyrimidine dimers are the principal DNA lesions produced by terrestrial sunlight / A. Besaratinia [et al.] // The FASEB Journal. – 2011. – Vol. 25 (9). – P. 3079–3091.

23. Lange, A. W. Both intra–and interstrand charge–transfer excited states in aqueous B–DNA are present at energies comparable to, or just above, the 1ππ* excitonic bright

states / A. W. Lange, J. M. Herbert // Journal of the American Chemical Society. – 2009. – Vol. 131 (11). – P. 3913–3922.

24. Aquino, A. J. A. The charge-transfer states in a stacked nucleobase dimer complex: A benchmark study / A. J. A. Aquino [et al.] // Journal of computational chemistry. – 2011. – Vol. 32 (7). – P. 1217–1227.

25. Spata, V. A. Bonded excimer formation in π–stacked 9–methyladenine dimers / V. A. Spata, Matsika S. // The Journal of Physical Chemistry A. – 2013. – Vol. 117 (36). – P. 8718–8728.

26. Plasser, F. Electronic excitation and structural relaxation of the adenine dinucleotide in gas phase and solution / F. Plasser, H. Lischka // Photochemical & Photobiological Sciences. – 2013. – Vol. 12 (8). – P. 1440–1452.

27. Ritze, H. H. Electronic coupling in the excited electronic state of stacked DNA base homodimers / H. H. Ritze, P. Hobza, D. Nachtigallová // Physical Chemistry Chemical Physics. – 2007. – Vol. 9 (14). – P. 1672–1675.

28. Plasser, F. UV absorption spectrum of alternating DNA duplexes. Analysis of excitonic and charge transfer interactions / F. Plasser [et al.] // The Journal of Physical Chemistry A. – 2012. – Vol. 116 (46). – P. 11151–11160.

29. Potaman, V. N. DNA: Alternative Conformations and Biology / V. N. Potaman, R. R Sinden // Madame Curie Bioscience Database. – Austin (TX): Landes Bioscience, 2000–2013.

30. Grosberg, Y. Polymers and Biopolymers from Physics Viewpoint Intellect / Y. Grosberg, A.R. Khokhlov. – Moscow, 2010.

31. Грищенко, А.Е. Самоорганизация полимерных молекул на межфазных границах / А.Е. Грищенко, А.И. Кононов, Н.А. Михайлова и др. – СПб.: Издательство С.–Петербургского университета, 2010. – 186 с.

32. Seeman, N. C. Nanomaterials based on DNA / N. C. Seeman // Annual review of biochemistry. – 2010. – Vol. 79. – P. 65–87.

33. Zikich, D. Ag+–Induced Arrangement of Poly(dC) into Compact Ring–Shaped Structures / D. Zikich, I. Lubitz, A. Kotlyar, // International Review of Biophysical Chemistry (I.RE.BI.C.) –2010 – Vol. 1 (1). – P. 1–6.

34. Kondo, J. A metallo–DNA nanowire with uninterrupted one–dimensional silver array / J. Kondo [et al.] // Nature chemistry. – 2017. – Vol. 9 (10). – P. 956–960.

35. Armitage, B. A. Cyanine dye–DNA interactions: intercalation, groove binding, and aggregation / B. A. Armitage // DNA binders and related subjects. – Springer, Berlin, Heidelberg, 2005. – P. 55–76.

36. Pinheiro, A. V. Challenges and opportunities for structural DNA nanotechnology / A. V. Pinheiro [et al.] // Nature nanotechnology. – 2011. – Vol. 6 (12). – P. 763–772.

37. Ruiz–Carretero, A. DNA–templated assembly of dyes and extended π–conjugated systems / A. Ruiz–Carretero [et al.] // Chemical Communications. – 2011. – Vol. 47 (15). – P. 4340–4347.

38. Wirth, J. Plasmonic nanofabrication by long–range excitation transfer via DNA nanowire / J. Wirth [et al.] // Nano letters. – 2011. – Vol. 11 (4). – P. 1505–1511.

39. Guo, A.–M. Enhanced spin–polarized transport through DNA double helix by gate voltage / A.–M. Guo, Q.–f. Sun // Phys. Rev. B. – 2012. – Vol. 86. – P. 035424.

40. Kuzyk, A. DNA–based self–assembly of chiral plasmonic nanostructures with tailored optical response / A. Kuzyk [et al.] // Nature. – 2012. – Vol. 483. – P. 311–314.

41. Toppari, J. J. Plasmonic coupling and long–range transfer of an excitation along a DNA Nanowire / J. J. Toppari [et al.] // ACS nano. – 2013. – Vol. 7. – P. 1291–1298.

42. Probst, M. A modular LHC built on the DNA three–way junction / M. Probst, S. M. Langenegger, R. Häner, // Chem. Commun. – 2014. – Vol. 50. – P. 159–161.

43. Obliosca, J. M. [et al.] DNA/RNA detection using DNA–templated few–atom silver nanoclusters / J. M. Obliosca [et al.] // Biosensors. – 2013. – Vol. 3 (2). – P. 185–200.

44. Choi, S. Developing Luminescent Silver Nanodots for Biological Applications / S. Choi, R. M. Dickson, J. Yu // Chem. Soc. Rev. – 2012. – Vol. 41. – P. 1867−1891.

45. Ramazanov, R. R. Excitation Spectra Argue for Threadlike Shape of DNA–Stabilized Silver Fluorescent Clusters / R. R. Ramazanov, A. I. Kononov // J. Phys. Chem. C. – 2013. – Vol. 117 (36). – P. 18681–18687.

46. Volkov, I. L. Fluorescent silver nanoclusters in condensed DNA / I. L. Volkov [et al.] // ChemPhysChem. – 2013. – Vol. 14 (15). – P. 3543–3550.

47. Volkov, I. L. DNA–Stabilized Silver Nanoclusters with High Yield of Dark State / I. L. Volkov, P. Yu. Serdobintsev, A. I. Kononov // J. Phys. Chem. C. – 2013. – Vol. 117 (45). – P. 24079–24083.

48. Volkov, I. L. DNA–Stabilized Silver Nanoclusters with High Yield of Dark State Probed by Fluorescence Saturation Spectroscopy / I. L. Volkov, P. Yu. Serdobintsev, A. I. Kononov // Biophys. J. – 2014. – Vol. 106(2). – P. 216a – 217a.

49. Ramazanov, R. R. Noncanonical Stacking Geometries of Nucleobases as a Preferred Target for Solar Radiation / R. R. Ramazanov, D. A. Maksimov, A. I. Kononov // J. Am. Chem. Soc. – 2015. – Vol. 137 (36). – P. 11656–11665.

50. Volkov, I. Fluorescence saturation spectroscopy in probing electronically excited states of silver nanoclusters / I. Volkov [et al.] // J. Lumin. – 2016. – Vol. 172. – P. 175–179.

51. Ramazanov, R. R. Ag−DNA Emitter: Metal Nanorod or Supramolecular Complex? / R. R. Ramazanov [et al.] // J. Phys. Chem. Lett. – 2016. – Vol. 7. – P. 3560−3566.

52. Vdovichev, A. A. Structure of fluorescent metal clusters on a DNA template / A. A. Vdovichev [et al.] // Journal of Physics Conference Series. – 2016. – Vol. 741(1). – P. 012069.

53. Reveguk, Z. Electronic excitation energy transport in a DNA–Ag cluster complex / Z. Reveguk, E. Ikonnikov A. Kononov // Journal of Physics Conference Series. – 2016. – Vol. 741(1). – P. 012051.

54. Maksimov, D.A. Excitation spectra of Ag3–DNA bases complexes: a Benchmark Study / D.A. Maksimov [et al.] // Chemical Physics Letters. – 2017. – Vol. 673. – P. 11–18.

55. Volkov, I. L. DNA with Ionic, Atomic and Clustered Silver: An XPS Study / I. L. Volkov [et al.] // J. Phys. Chem. B. – 2017. – Vol. 121 (11). – P. 2400–2406.

56. Volkov, I. L. DNA as UV light–harvesting antenna / I. L. Volkov [et al.] // Nucleic Acids Res. – 2018. – Vol. 46 (7). – P. 3543–3551.

57. Reveguk, Z. Ultrafast fluorescence dynamics of DNA–based silver clusters / Z. Reveguk [et al.] // Phys. Chem. Chem. Phys. – 2018. – Vol. 20. – P. 28205–28210.

58. Reveguk, Z. V. Exciton Absorption and Luminescence in i–Motif DNA / Z. V. Reveguk [et al.] // Sci. Rep. – 2019. – Vol. 9. – Article number 15988.

59. Yang, M. Influence of Phonons on Exciton Transfer Dynamics: Comparison of the Redfield, Förster, and Modified Redfield Equations / M. Yang, G. R. Fleming // Chem. Phys. – 2002. – Vol. 275. – P. 355–372.

60. Kozak, C. R. Excited–state energies and electronic couplings of DNA base dimmers / C. R. Kozak [et al.] // The Journal of Physical Chemistry B. – 2010. – Vol. 114 (4). – P. 1674–1683.

61. May, V. Charge and Energy Transfer Dynamics in Molecular Systems / V. May, O. Kühn. – Wiley–VCH, 2000. – 559 p.

62. Strümpfer, J. Light Harvesting Complex II B850 Excitation Dynamics / J. Strümpfer, K. Schulten // J. Chem. Phys. – 2009. – Vol. 131. – P. 225101.

63. Novoderezhkin, V. I. Physical origins and models of energy transfer in photosynthetic light–harvesting / V. I. Novoderezhkin [et al.] // Phys. Chem. Chem. Phys. – 2010. – Vol. 12. – P. 7352–7365.

64. Strümpfer, J. How quantum coherence assists photosynthetic light–harvesting / J. Strümpfer, M. Şener, K. Schulten // Journal of Physical Chemistry Letters. – 2012. – Vol. 3. – P. 536–542.

65. Kononov, A. I. Exciton effects in dinucleotides and polynucleotides / A. I. Kononov, V. M. Bakulev, V. L. Rapoport // J. Photochem. Photobiol. B: Biol. – 1993. – Vol. 19. – P. 139–144.

66. Improta, R. Quantum Mechanical Studies on the Photophysics and the Photochemistry of Nucleic Acids and Nucleobases / R. Improta, F. Santoro, L. Blancafort // Chem. Rev. – 2016. – Vol. 116. – P. 3540–3593.

67. Bouvier, B. Dipolar coupling between electronic transitions of the DNA bases and its relevance to exciton states in double helices / B. Bouvier [et al.] // Chem. Phys. – 2002. – Vol. 275. – P. 75–92

68. Bouvier, B. Influence of conformational dynamics on the exciton states of DNA oligomers / B. Bouvier, J–P. Dognon, R. Lavery // J. Phys. Chem. B. – 2003. – Vol. 107. – P. 13512–13522.

69. Emanuele, E. Exciton states of dynamic DNA double helices: alternating dCdG sequences / E. Emanuele [et al.] // J. Phys. Chem. B. – 2005. – Vol. 109. – P. 16109–16118.

70. Emanuele, E. UV spectra and excitation delocalization in DNA: influence of the spectral width / E. Emanuele [et al.] // ChemPhysChem. – 2005. – Vol. 6. – P. 1387–1393.

71. Nachtigallová, D. Electronic splitting in the excited states of DNA base homodimers and –trimers: an evaluation of short–range and Coulombic interactions / D. Nachtigallová, P. Hobza, H.–H. Ritze // Phys. Chem. Chem. Phys. – 2008. – Vol. 10. – P. 5689.

72. Crespo–Hernández, C. E. Base stacking controls excited–state dynamics in A·T DNA / C. E. Crespo–Hernández, B. Cohen, B. Kohler // Nature. – 2005. – Vol. 436. – P. 1141–1144.

73. Su, C. Base–Stacking Disorder and Excited–State Dynamics in Single–Stranded Adenine Homo–oligonucleotides / C. Su, C. T. Middleton, B. Kohler // J. Phys. Chem. B. – 2012. – Vol. 116. – P. 10266–10274.

74. Kwok, W.–M. Femtosecond Time– and Wavelength–Resolved Fluorescence and Absorption Spectroscopic Study of the Excited States of Adenosine and an Adenine Oligomer / W.–M. Kwok, C. Ma, D. L. Phillips // J. Am. Chem. Soc. – 2006. – Vol. 128. – P. 11894–11905.

75. Improta, R. Interplay between “Neutral” and “Charge–Transfer” Excimers Rules the Excited State Decay in Adenine–Rich Polynucleotides / R. Improta, V. Barone // Angew. Chem. Int. Ed. – 2011. – Vol. 50. – P. 12016–12019.

76. Banyasz, A. Multi–Pathway Excited State Relaxation of Adenine Oligomers in Aqueous Solution: A Joint Theoretical and Experimental Study / A. Banyasz [et al.] // Chem. Eur. J. – 2013. – Vol. 19. – P. 3762–3774.

77. Buchvarov, I. Electronic energy delocalization and dissipation in single– and double–stranded DNA / I. Buchvarov [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. – 2007. – Vol. 104. – P. 4794–4797.

78. Markovitsi, D. Collective behavior of franck−condon excited states and energy transfer in DNA double helices / D. Markovitsi [et al.] // J. Amer. Chem. Soc. – 2005. – Vol. 127. – P. 17130–17131.

79. Markovitsi, D. Molecular spectroscopy: complexity of excited–state dynamics in DNA / D. Markovitsi [et al.] // Nature. – 2006. – Vol. 441. – P. E7–E7.

80. Markovitsi, D. Excited states and energy transfer among DNA bases in double helices. Photochem / D. Markovitsi, T. Gustavsson, F. Talbot // Photobiol. Sci. – 2007. – Vol. 6. – P. 717–724.

81. Miannay, F.–A. Ultrafast Excited–State Deactivation and Energy Transfer in Guanine−Cytosine DNA Double Helices / F.–A. Miannay [et al.] // J. Am. Chem. Soc. – 2007. – Vol. 129. – P. 14574–14575.

82. Vayá, I. Fluorescence of natural DNA: from the femtosecond to the nanosecond time scales / I. Vayá [et al.] // J. Amer. Chem. Soc. – 2010. – Vol. 132. – P. 11834–11835.

83. Gustavsson, T. Femtosecond fluorescence studies of DNA/RNA constituents / T. Gustavsson, A. Banyasz, R. Improta // J. Phys. Conf. Ser. – 2011. – Vol. 261. – P. 12009.

84. Vayá, I. Electronic Excitation Energy Transfer between Nucleobases of Natural DNA / I. Vayá [et al.] // J. Am. Chem. Soc. – 2012. – Vol. 134. – P. 11366–11368.

85. Kadhane, U. Strong coupling between adenine nucleobases in DNA single strands revealed by circular dichroism using synchrotron radiation / U. Kadhane [et al.] // Phys. Rev. E – Stat. Nonlinear, Soft Matter Phys. – 2008. – Vol. 77. – P. 21901.

86. Novoderezhkin, V. I. Excitonic interactions in the light–harvesting antenna of photosynthetic purple bacteria and their influence on picosecond absorbency difference spectra / V. I. Novoderezhkin, A. P. Razjivin // FEBS Lett. – 1993. – Vol. 330. – P. 5–7.

87. Novoderezhkin, V. Exciton (de)localization in the LH2 antenna of Rhodobacter sphaeroides as revealed by relative difference absorption measurements of the LH2 antenna and the B820 subunit / V. Novoderezhkin, R. Monshouwer, R. van Grondelle // J. Phys. Chem. B. – 1999. – Vol. 103. – P. 10540–10548.

88. Kononov, A. I. Photophysical Processes in the Complexes of DNA with Ethidium

Bromide and Acridine Orange: A Femtosecond Study / Kononov, A. I. [et al.] // J. Phys. Chem. B. – 2001. – Vol. 105. – P. 535–541.

89. Takaya, T. UV excitation of single DNA and RNA strands produces high yields of exciplex states between two stacked bases / T. Takaya [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2008. – Vol. 105. – P. 10285–10290.

90. Schreier, W.J. Thymine dimerization in DNA is an ultrafast photoreaction / W.J. Schreier [et al.] // Science. – 2007. – Vol. 315. – P. 625–629.

91. Johnson, A. T. Structure and dynamics of poly (T) single–strand DNA: implications toward CPD formation / A. T. Johnson, O. Wiest // The Journal of Physical Chemistry B. – 2007. – Vol. 111 (51). – P. 14398–14404.

92. Law, Y. K. Predicting thymine dimerization yields from molecular dynamics simulations / Y. K. Law [et al.] // Biophysical journal. – 2008. – Vol. 94 (9). – P. 3590–3600.

93. Improta, R. Photophysics and photochemistry of thymine deoxy–dinucleotide in water: A PCM/TD–DFT quantum mechanical study / R. Improta // The Journal of Physical Chemistry B. – 2012. – Vol. 116 (49). – P. 14261–14274.

94. Spata V. A. Role of excitonic coupling and charge–transfer states in the absorption and CD spectra of Adenine–based oligonucleotides investigated through QM/MM simulations / V. A. Spata, S. Matsika // The Journal of Physical Chemistry A. – 2014. – Vol. 118 (51). – P. 12021–12030.

95. Rapoport, V. L. Luminescent conformers of adenyl dinucleotide with strong exciton interaction between nitrogen bases / V. L. Rapoport, A. I. Kononov // Doklady Akademii nauk SSSR. – 1988. – Vol. 298 (1). – P. 231–235.

96. Kononov, A. I. Luminescence excitation spectra reveal low–lying excited states in stacked adenine bases / A. I. Kononov, M. N. Bukina // Journal of Biomolecular Structure and Dynamics. – 2002. – Vol. 20 (3). – P. 465–471.

97. Banyasz, A. Base pairing enhances fluorescence and favors cyclobutane dimer formation induced upon absorption of UVA radiation by DNA / A. Banyasz [et al.] // Journal of the American Chemical Society. – 2011. – Vol. 133 (14). – P. 5163–5165.

98. Кононов, А.И. Исследование возбужденных электронных состояний в полинуклеотидах и комплексах ДНК с красителями: диссертация на соискание ученой степени кандидата физико–математических наук: 01.04.07 / А.И. Кононов. – Санкт–Петербург, 2001. – 99 с.

99. Banyasz, A. Electronic excited states responsible for dimer formation upon UV absorption directly by thymine strands: joint experimental and theoretical study / A. Banyasz [et al.] // Journal of the American Chemical Society. – 2012. – Vol. 134 (36). – P. 14834–14845.

100. Becker, M. M. "Ultraviolet footprinting" accurately maps sequence–specific contacts and DNA kinking in the EcoRI endonuclease–DNA complex / M. M. Becker [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1988. – Vol. 85 (17). – P. 6247–6251.

101. Pfeifer, G. P. Binding of transcription factors creates hot spots for UV photoproducts in vivo / G. P. Pfeifer [et al.] // Molecular and cellular biology. – 1992. – Vol. 12 (4). – P. 1798–1804.

102. Tyrrell, R. M. Mutagenic action of monochromatic UV radiation in the solar range on human cells / R. M. Tyrrell // Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. – 1984. – Vol. 129 (1). – P. 103–110.

103. Mitchell, D. L. Sequence specificity of cyclobutane pyrimidine dimers in DNA treated with solar (ultraviolet B) radiation / D. L. Mitchell, J. Jen, J. E. Cleaver // Nucleic acids research. – 1992. – Vol. 20 (2). – P. 225–229.

104. Pfeifer, G. P. UV wavelength–dependent DNA damage and human non–melanoma and melanoma skin cancer / G. P. Pfeifer, A. Besaratinia // Photochemical & photobiological sciences. – 2012. – Vol. 11 (1). – P. 90–97.

105. Tommasi, S. Sunlight induces pyrimidine dimers preferentially at 5–methylcytosine bases / S. Tommasi, M. F. Denissenko, G. P. Pfeifer // Cancer research. – 1997. – Vol. 57 (21). – P. 4727–4730.

106. Gale, J. M. UV–induced formation of pyrimidine dimers in nucleosome core DNA is strongly modulated with a period of 10.3 bases / J. M. Gale, K. A. Nissen, M. J.

Smerdon // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1987. – Vol. 84 (19). – P. 6644–6648.

107. Selleck, S. B. Photofootprinting in vivo detects transcription–dependent changes in yeast TATA boxes / S. B. Selleck, J. Majors // Nature. – 1987. – Vol. 325 (6100). – P. 173–177.

108. Freeman, S. E. Wavelength dependence of pyrimidine dimer formation in DNA of human skin irradiated in situ with ultraviolet light / S. E. Freeman [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1989. – Vol. 86 (14). – P. 5605–5609.

109. Garces, F. Alterations in DNA irradiated with ultraviolet radiation—I. The formation process of cyclobutylpyrimidine dimers: cross sections, action spectra and quantum yields / F. Garces, C. A. Davila // Photochemistry and photobiology. – 1982. – Vol. 35 (1). – P. 9–16.

110. Leupold, D. Size Enhancement of Transition Dipoles to One– and Two–Exciton Bands in a Photosynthetic Antenna / D. Leupold [et al.] // Phys. Rev. Lett. – 1996. – Vol. 77. – P. 4675–4678.

111. Engel, G. S. Evidence for Wavelike Energy Transfer Through Quantum Coherence in Photosynthetic Systems / G. S. Engel [et al.] // Nature. – 2007. – Vol. 446. – P. 782–786.

112. Rayner, D. M. Singlet energy transfer between nucleic acid bases and dyes in intercalation complexes / D. M. Rayner [et al.] // J. Phys. Chem. – 1980. – Vol. 84. – P. 289–293.

113. Nostrand, van F. Singlet excitation transfer from poly rA to bound dye at 77K / F. van Nostrand, R. M. Pearlstein // Chem. Phys. Lett. – 1976. – Vol. 39. – P. 269–272.

114. Pearlstein, R. M. Time dependence of triplet–singlet excitation transfer from compact poly rA to bound dye at 77 K / R. M. Pearlstein, F. van Nostrand, J. A. Nairn // Biophys. J. – 1979. – Vol. 26. – P. 61–72.

115. Rist, M. Exciton and Excimer Formation in DNA at Room Temperature / M. Rist, H.–A. Wagenknecht, T. Fiebig // ChemPhysChem. – 2002. – Vol. 3. – P. 704–707.

116. Dumas, A. Highly fluorescent guanosine mimics for folding and energy transfer

studies / A. Dumas, N. W. Luedtke // Nucleic Acids Res. – 2011. – Vol. 39. – P. 6825–6834.

117. O'Neill, P. R. UV Excitation of DNA Stabilized Ag Cluster Fluorescence via the DNA Bases / P. R. O'Neill [et al.] // J. Phys. Chem. C. – 2011. – Vol. 115. – P. 24061–24066.

118. Jin, R. Atomically precise metal nanoclusters: stable sizes and optical properties / R. Jin // Nanoscale. – 2015. – Vol. 7 (5). – P. 1549–1565.

119. Chakraborty, I. Atomically precise clusters of noble metals: emerging link between atoms and nanoparticles / I. Chakraborty, T. Pradeep // Chemical reviews. – 2017. – Vol. 117 (12). – P. 8208–8271.

120. Lu, Y. Sub–Nanometre Sized Metal Clusters: From Synthetic Challenges to the Unique Property Discoveries / Y. Lu, W. Chen // Chem. Soc. Rev. — 2012. – Vol. 41. – P. 3594–3623.

121. Petty, J. T. DNA–templated Ag nanocluster formation / J. T. Petty [et al.] // Journal of the American Chemical Society. – 2004. – Vol. 126 (16). – P. 5207–5212.

122. Han, B. DNA–templated fluorescent silver nanoclusters / B. Han, E. Wang // Anal Bioanal Chem. – 2012. – Vol. 402. – P. 129–138.

123. Yu. J. Live cell surface labeling with fluorescent Ag nanocluster composites / J. Yu [et al.] // Photochem. Photobiol. – 2008. – Vol. 84. – P. 1435.

124. Li, T. Ion–tuned DNA/Ag fluorescent nanoclusters as versatile logic device / T. Li [et al.] // ACS Nano. – 2011. – Vol. 5. – P. 6334–6338.

125. Guo, W. Strand exchange reaction modulated fluorescence "on–off" switching of hybridized DNA duplex stabilized silver nanoclusters / W. Guo, J. Yuan, E.K. Wang // Chem. Comm. – 2011. – Vol. 47 – P. 10930–10933.

126. Guo, W.W. Highly sequence dependent formation of fluorescent silver nanoclusters in hybridized DNA duplexes for single nucleotide mutation identification / W.W. Guo // J. Am. Chem. Soc. – 2010. – Vol. 132. – P. 932–934.

127. Ma, K. DNA abasic site–directed formation of fluorescent silver nanoclusters for selective nucleobase recognition / Ma, K [et al.] // Nanotechnology. – 2011. – Vol. 22. – P. 305502–305507.

128. Yeh, H.–C. A fluorescence light–up Ag nanocluster probe that discriminates single–nucleotide variants by emission color / H.–C. Yeh [et al.] // J. Am. Chem. Soc. – 2012. – Vol. 134. – P. 11550–11558.

129. Yang, S.W. Rapid detection of microRNA by a silver nanocluster DNA probe / S.W. Yang, T. Vosch // Anal. Chem. – 2011. – Vol. 83. – P. 6935–6939.

130. Yeh, H.–C. A DNA–silver nanocluster probe that fluoresces upon hybridization / H.–C. Yeh [et al.] // Nano Lett. – 2010. – Vol. 10. – P. 3106–3110.

131. Yuan, Z. Fluorescent silver nanoclusters stabilized by DNA scaffolds. Chem / Z. Yuan [et al.] // Comm. – 2014. – Vol. 50. – P. 8900–9815.

132. Schultz, D. Silver Atom and Strand Numbers in Fluorescent and Dark Ag:DNAs / Schultz, D.; Gwinn, E. G. // Chem. Commun. (Cambridge, England). – 2012. – Vol. 48. – P. 5748–5750.

133. Petty, J. T. A Silver Cluster–DNA Equilibrium / J. T. Petty [et al.] // Anal. Chem. – 2013. – Vol. 85. – P. 9868–9876.

134. Samanta, P. K. Computational Studies on Structural and Optical Properties of Single–Stranded DNA Encapsulated Silver/gold Clusters / Samanta, P. K. [et al.] // J. Mater. Chem. – 2012. Vol. 22. – P. 6774.

135. Soto-Verdugo. V. The Properties of Small Ag Clusters Bound to DNA Bases / V. Soto-Verdugo, H. Metiu, E. Gwinn // J. Chem. Phys. – 2010. – Vol. 132. – P. 195102.

136. Zhu, M. Correlating the Crystal Structure of A Thiol–Protected Au 25 Cluster and Optical Properties / M. Zhu [et al.] // J. Am. Chem. Soc. – 2008. – Vol. 130. – P. 5883–5885.

137. Gell, L. Tuning Structural and Optical Properties of Thiolate–Protected Silver Clusters by Formation of a Silver Core with Confined Electrons / L. Gell [et al.] // J. Phys. Chem. C. – 2013. – Vol. 117. – P. 14824–14831.

138. Lecoultre, S. Ultraviolet–visible absorption of small silver clusters in neon: Ag n (n= 1–9) / S. Lecoultre [et al.] // The Journal of chemical physics. – 2011. – Vol. 134 (18). – P. 184504.

139. Matulis, V. E. DFT study of electronic structure and geometry of neutral and anionic silver clusters / V. E. Matulis, O. A. Ivashkevich, V. S. Gurin // Journal of Molecular Structure: THEOCHEM. – 2003. – Vol. 664. – P. 291–308.

140. Bonačić–Koutecký, V. An accurate relativistic effective core potential for excited states of Ag atom: An application for studying the absorption spectra of Ag n and Ag n+ clusters / V. Bonačić–Koutecký [et al.] // The Journal of chemical physics. – 1999. – Vol. 110 (8). – P. 3876–3886.

141. Harb, M. Optical absorption of small silver clusters: Ag n, (n= 4–22) / M. Harb [et al.] // The Journal of chemical physics. – 2008. – Vol. 129 (19). – P. 194108.

142. Guidez, E. B. Theoretical analysis of the optical excitation spectra of silver and gold nanowires / E. B. Guidez, C. M. Aikens // Nanoscale. – 2012. – Vol. 4 (14). – P. 4190–4198.

143. Swasey, S. M. Chiral Electronic Transitions in Fluorescent Silver Clusters Stabilized by DNA / S. M. Swasey [et al.] // ACS Nano. – 2014. – Vol. 8. – P. 6883−6892.

144. Copp, S. M. Cluster Plasmonics: Dielectric and Shape Effects on DNA–Stabilized Silver Clusters / S. M. Copp [et al.] // Nano Lett. – 2016. – Vol. 16. – P. 3594−3599.

145. Harbich, W. Deposition of mass selected silver clusters in rare gas matrices / W. Harbich // J. Chem. Phys. – 1990. – Vol. 93. – P. 8535−8543.

146. Rabin, I. Absorption and fluorescence spectra of Ar–matrixisolated Ag3 clusters / I. Rabin [et al.] // Chem. Phys. Lett. – 2000. – Vol. 320. – P. 59−64.

147. De Cremer, G. Characterization of Fluorescence in Heat–Treated Silver–Exchanged Zeolites / G. De Cremer [et al.] // J. Am. Chem. Soc. – 2009. – Vol. 131. – P. 3049−3056.

148. Altantzis, T. Direct Observation of Luminescent Silver Clusters Confined in Faujasite Zeolites / T. Altantzis [et al.] // ACS Nano. – 2016. – Vol. 10. – P. 7604.

149. Schultz, D. Evidence for Rod–Shaped DNA–Stabilized Silver Nanocluster Emitters / D. Schultz [et al.] // Adv. Mater. – 2013. – Vol. 25. – P. 2797–2803.

150. Copp, S. M. Magic Numbers in DNA–Stabilized Fluorescent Silver Clusters Lead to Magic Colors / S. M. Copp // J. Phys. Chem. Lett. – 2014. – Vol. 5. – P. 959–963.

151. Gwinn, E. G. Sequence-Dependent fluorescence of DNA-Hosted silver nanoclusters / E. G. Gwinn [et al.] // Advanced Materials. – 2008. – Vol. 20 (2). – P. 279–283.

152. Huang, Z. Site–specific DNA–programmed growth of fluorescent and functional silver nanoclusters / Z. Huang [et al.] // Chemistry. – 2011. – Vol. 17. – P. 3774–3780.

153. Ono, A. Specific interactions between silver(I) ions and cytosine–cytosine pairs in DNA duplexes / A. Ono [et al.] // Chem. Commun. (Camb). – 2008. – Vol. 39. – P. 4825–4827.

154. Megger, D. A. Silver(I)–mediated cytosine self–pairing is preferred over hoogsteen–type base pairs with the artificial nucleobase 1,3–dideaza–6–nitropurine. Nucleosides / D. A. Megger, J. Muller // Nucleotides Nucleic Acids. – 2010. – Vol. 29. – P. 27–38.

155. Urata, H. Pyrimidine–pyrimidine base pairs stabilized by silver(I) ions / H. Urata [et al.] // Chem. Commun. (Camb). – 2011. – Vol. 47. – P. 941–943.

156. Swasey, S. M. Silver (I) as DNA glue: Ag(+)–mediated guanine pairing revealed by removing Watson–Crick constraints / S. M. Swasey [et al.] // Sci. Rep. – 2015. – Vol. 5. – P. 10163–10171.

157. Petty, J. T. A Segregated, Partially Oxidized, and Compact Ag10 Cluster within an Encapsulating DNA Host / J. T. Petty [et al.] // J. Am. Chem. Soc. – 2016. – Vol. 138. – P. 3469–3477.

158. Huard, D. J. E. Atomic Structure of a Fluorescent Ag8 Cluster Templated by a Multistranded DNA Scaffold / D. J. E. Huard [et al.] // J. Am. Chem. Soc. – 2019. – Vol. 141. – P. 11465–11470.

159. Bogh, S. A. Unusually large Stokes shift for a near–infrared emitting DNA–stabilized silver nanocluster / S. A. Bogh [et al.] // Methods and applications in fluorescence. – 2018. – Vol. 6 (2). – P. 024004.

160. Hsu, H. C. DNA stabilized silver nanoclusters as the fluorescent probe for studying the structural fluctuations and the solvation dynamics of human telomeric

DNA / H. C. Hsu [et al.] // New Journal of Chemistry. – 2015. – Vol. 39 (3). – P. 2140–2145.

161. Wang, K. H. The spectral relaxation dynamics and the molecular crowding effect of silver nanoclusters synthesized in the polymer scaffold / K. H. Wang, C. W. Chang // Physical Chemistry Chemical Physics. – 2015. – Vol. 17 (35). – P. 23140–23146.

162. Bogh, S. A. Excited–State Relaxation and Förster Resonance Energy Transfer in an Organic Fluorophore/Silver Nanocluster Dyad / S. A. Bogh [et al.] // Acs Omega. – 2017. – Vol. 2 (8). – P. 4657–4664.

163. Cerretani, C. Temperature dependent excited state relaxation of a red emitting DNA–templated silver nanocluster / C. Cerretani [et al.] // Chemical Communications. – 2017. – Vol. 53 (93). – P. 12556–12559.

164. Patel, S. A. Electron transfer–induced blinking in Ag nanodot fluorescence / S. A. Patel [et al.] // The Journal of Physical Chemistry C. – 2009. – Vol. 113 (47). – P. 20264–20270.

165. Thyrhaug, E. Ultrafast coherence transfer in DNA–templated silver nanoclusters / E. Thyrhaug [et al.] // Nature communications. – 2017. –Vol. 8 (1). – P. 1–7.

166. Hsiang, J. C. Dark State–Modulated Fluorescence Correlation Spectroscopy for Quantitative Signal Recovery / J. C. Hsiang, B. C. Fleischer, R. M. Dickson // The journal of physical chemistry letters. – 2016. – Vol. 7 (13). – P. 2496–2501.

167. Fadeev, V.V. Saturation spectroscopy as a method for determining the photophysical parameters of complicated organic compounds / V. V. Fadeev, T. A. Dolenko, E. M. Filippova [et al.] // Opt. Commun. – 1999. – Vol. 166 (1–6). – P. 25–33.

168. Valeur, B. Molecular Fluorescence: Principles and Applications / B. Valeur, M.N. Berberan–Santos. – 2nd edition. – Wiley–VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, 2012.

169. Parker, C.A. Photoluminescence of solutions: With applications to photochemistry and analytical chemistry / C.A. Parker. – Elsevier Pub. Co., 1968.

170. Briggs, D. Surface Analysis by Auger and X–Ray Photoelectron Spectroscopy / D. Briggs, J. T. Grant. – IM Publications: Charlton, U.K., 2003.

171. Pronk, S. GROMACS 4.5: a high–throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit / S. Pronk [et al.] // Bioinformatics. – 2013. – Vol. 29 (7). – P. 845–854.

172. Pérez, A. Refinement of the AMBER force field for nucleic acids: improving the description of alpha/gamma conformers / A. Pérez [et al.] // Biophys. J. – 2007. – Vol. 92. – P. 3817–3829.

173. Darden T. Particle mesh Ewald: An N-log (N) method for Ewald sums in large systems / T. Darden, D. York, L. Pedersen // The Journal of chemical physics. – 1993. – Vol. 98 (12). – P. 10089–10092.

174. Hess, B. LINCS: a linear constraint solver for molecular simulations / B. Hess [et al.] // Journal of computational chemistry. – 1997. – Vol. 18 (12). – P. 1463–1472.

175. Bernholdt, D. E. Large–scale correlated electronic structure calculations: the RI–MP2 method on parallel computers / D. E. Bernholdt, R. J. Harrison // Chemical Physics Letters. – 1996. – Vol. 250 (5–6). – P. 477–484.

176. Dunning, Jr T. H. Gaussian basis sets for use in correlated molecular calculations. I. The atoms boron through neon and hydrogen / Jr T. H. Dunning // The Journal of chemical physics. – 1989. – Vol. 90 (2). – P. 1007–1023.

177. Neese, F. The ORCA program system / F. Neese // Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science. – 2012. – Vol. 2 (1). – P. 73–78.

178. Head–Gordon, M. A doubles correction to electronic excited states from configuration interaction in the space of single substitutions / M. Head–Gordon [et al.] // Chemical Physics Letters. – 1994. – Vol. 219 (1–2). – P. 21–29.

179. Christiansen, O. The second–order approximate coupled cluster singles and doubles model CC2 / O. Christiansen, H. Koch, P. Jørgensen // Chemical Physics Letters. – 1995. – Vol. 243 (5–6). – P. 409–418.

180. Trofimov, A. B. An efficient polarization propagator approach to valence electron excitation spectra / A. B. Trofimov, J. Schirmer // Journal of Physics B: Atomic, Molecular and Optical Physics. – 1995. – Vol. 28 (12). – P. 2299–2324.

181. Hättig, C. CC2 excitation energy calculations on large molecules using the resolution of the identity approximation / C. Hättig, F. Weigend // The Journal of Chemical Physics. – 2000. – Vol. 113 (13). – P. 5154–5161.

182. A package for Theoretical Density, Orbital Relaxation and Exciton analysis [Electronic resource] // TheoDore. – Mode of access: http://theodore–qc.sourceforge.net/index.html.

183. Tretiak, S. Density matrix analysis and simulation of electronic excitations in conjugated and aggregated molecules / S. Tretiak, S. Mukamel // Chemical reviews. – 2002. – Vol. 102 (9). – P. 3171–3212.

184. Ahlrichs, R. Electronic structure calculations on workstation computers: The program system turbomole / R. Ahlrichs [et al.] // Chemical Physics Letters. – 1989. – Vol. 162 (3). – P. 165–169.

185. VandeVondele, J. Quickstep: Fast and accurate density functional calculations using a mixed Gaussian and plane waves approach / J. VandeVondele [et al.] // Comput. Phys. Commun. – 2005. – Vol. 167. – P. 103–128.

186. Goedecker, S. Separable dual–space Gaussian pseudopotentials / S. Goedecker, M. Teter, J. Hutter // Phys. Rev. B. – 1996. – Vol. 54. – P. 1703–1710.

187. VandeVondele, J. Gaussian basis sets for accurate calculations on molecular systems in gas and condensed phases / J. VandeVondele, J. Hutter // J. Chem. Phys. – 2007. – Vol. 127. – P. 114105–114109.

188. Perdew, J. P. Generalized Gradient Approximation Made Simple / J.P. Perdew, K. Burke, M. Ernzerhof // Phys. Rev. Lett. – 1996. – Vol. 77. – P. 3865–3868.

189. Adamo, C. Toward Reliable Density Functional Methods without Adjustable Parameters: The PBE0 Model / C. Adamo, V. Barone // J. Chem. Phys. – 1999. – Vol. 110. – P. 6158–6170.

190. Weigend, F. Balanced Basis Sets of Split Valence, Triple Zeta Valence and Quadruple Zeta Valence Quality for H to Rn: Design and Assessment of Accuracy / F. Weigend, R. Ahlrichs // Phys. Chem. Chem. Phys. – 2005. – Vol. 7. – P. 3297–3305.

191. Granovsky, A. A. Firefly Version 8 [Electroniv resource] / A. A. Granovsky // Firefly. – Mode of access: www http//classic.chem.msu.su/gran/firefly/index.html.

192. Zhao, Y. The M06 suite of density functionals for main group thermochemistry, thermochemical kinetics, noncovalent interactions, excited states, and transition elements: two new functionals and systematic testing of four M06–class functionals and 12 other functionals, Theor / Y. Zhao, D.G. Truhlar, // Chem. Acc. – 2008. – Vol.120 (1). – P. 215–241.

193. Gordon, M. S. Advances in electronic structure theory: GAMESS a decade later / M. S. Gordon, M. W. Schmidt // Theory and applications of computational chemistry / Ed. C.E. Dykstra. – Elsevier, 2005. – P. 1167–1189.

194. Hay, P. J. Ab initio effective core potentials for molecular calculations. Potentials for the transition metal atoms Sc to Hg / P. J. Hay, W. R. Wadt // The Journal of chemical physics. – 1985. – Vol. 82 (1). – P. 270–283.

195. Hariharan, P. C. The influence of polarization functions on molecular orbital hydrogenation energies / P. C. Hariharan, J. A. Pople // Theoretica chimica acta. – 1973. – Vol. 28 (3). – P. 213–222.

196. Hammer, B. Improved adsorption energetics within density–functional theory using revised Perdew–Burke–Ernzerhof functional / B. Hammer, L. B. Hansen, J. K. Nørskov // Physical review B. – 1999. – Vol. 59 (11). – P. 7413–7421.

197. Becke A. D. Density–functional exchange–energy approximation with correct asymptotic behavior // Physical review A. – 1988. – Vol. 38 (6). – P. 3098–3100.

198. Soler–López, M. Solvent Organization in an Oligonucleotide Crystal THE STRUCTURE OF d (GCGAATTCG) 2 AT ATOMIC RESOLUTION / M. Soler–López, L. Malinina, J. A. Subirana // Journal of Biological Chemistry. – 2000. – Vol. 275 (30). – P. 23034–23044.

199. Kielkopf, C. L. Conformational flexibility of B–DNA at 0.74 Å resolution: d (CCAGTACTGG) 2 / C. L. Kielkopf [et al.] // Journal of molecular biology. – 2000. – Vol. 296 (3). – P. 787–801.

200. McCullagh, M. Conformational control of TT dimerization in DNA conjugates. A molecular dynamics study / M. McCullagh [et al.] // The Journal of Physical Chemistry B. – 2010. – Vol. 114 (15). – P. 5215–5221.

201. Fisher, G.J. Pyrimidine photohydratcs / G.J. Fisher, H.E. Johns // Photochem. Photobiol. Nucleic Acids / Ed. S. Y. Wang. – Acad. Press. New York, 1976. – Vol. 1. – P. 225–294.

202. Nonin, S. Solution structure and base pair opening kinetics of the i–motif dimer of d (5mCCTTTACC): a noncanonical structure with possible roles in chromosome stability / S. Nonin, A. T. Phan, J. L. Leroy // Structure. – 1997. – Vol. 5 (9). – P. 1231–1247.

203. Jourdan, M. Double threading through DNA: NMR structural study of a bis–naphthalene macrocycle bound to a thymine–thymine mismatch / M. Jourdan [et al.] // Nucleic acids research. – 2012. – Vol. 40 (11). – P. 5115–5128.

204. Smirnov, S. Integrity of duplex structures without hydrogen bonding: DNA with pyrene paired at abasic sites / S. Smirnov [et al.] // Nucleic acids research. – 2002. – Vol. 30 (24). – P. 5561–5569.

205. Serrano–Pérez, J. J. Theoretical insight into the intrinsic ultrafast formation of cyclobutane pyrimidine dimers in UV–irradiated DNA: Thymine versus cytosine / J. J. Serrano–Pérez [et al.] // The Journal of Physical Chemistry B. – 2008. – Vol. 112 (45). – P. 14096–14098.

206. Kumar, S. The isolation and characterisation of a new type of dimeric adenine photoproduct in UV–irradiated deoxyadenylates / S. Kumar [et al.] // Nucleic acids research. – 1987. – Vol. 15 (3). – P. 1199–1216.

207. Wei, H. Singlet oxygen involvement in ultraviolet (254 nm) radiation–induced formation of 8–hydroxy–deoxyguanosine in DNA / H. Wei [et al.] // Free Radical Biology and Medicine. – 1997. – Vol. 23 (1). – P. 148–154.

208. Doorley, G. W. Tracking DNA excited states by picosecond–time–resolved infrared spectroscopy: signature band for a charge–transfer excited state in stacked adenine–thymine systems / G. W. Doorley [et al.] // The Journal of Physical Chemistry Letters. – 2013. – Vol. 4 (16). – P. 2739–2744.

209. Zhang, Y. UV–induced proton transfer between DNA strands / Y. Zhang [et al.] // Journal of the American Chemical Society. – 2015. – Vol. 137 (22). – P. 7059–7062.

210. 209 Lin, C. H. Encapsulating an amino acid in a DNA fold / C. H. Lin, D. J. Patel // Nature structural biology. – 1996. – Vol. 3 (12). – P. 1046–1050.

211. Flinders, J. A pH controlled conformational switch in the cleavage site of the VS ribozyme substrate RNA / J. Flinders, T. Dieckmann // Journal of molecular biology. – 2001. – Vol. 308 (4). – P. 665–679.

212. Plasser, F. Analysis of excitonic and charge transfer interactions from quantum chemical calculations / F. Plasser, H. Lischka // Journal of chemical theory and computation. – 2012. – Vol. 8 (8). – P. 2777–2789.

213. Schreier, W. J. Thymine dimerization in DNA model systems: cyclobutane photolesion is predominantly formed via the singlet channel / W. J. Schreier [et al.] // Journal of the American Chemical Society. – 2009. – Vol. 131 (14). – P. 5038–5039.

214. Boggio–Pasqua, M. Ultrafast deactivation channel for thymine dimerization / M. Boggio–Pasqua [et al.] // Journal of the American Chemical Society. – 2007. – Vol. 129 (36). – P. 10996–10997.

215. Blancafort, L. Modeling thymine photodimerizations in DNA: mechanism and correlation diagrams / L. Blancafort, A. Migani // Journal of the American Chemical Society. – 2007. – Vol. 129 (47). – P. 14540–14541.

216. Johns, H. E. Properties of the triplet states of thymine and uracil in aqueous solution / H. E. Johns, D. W. Whillans // Journal of the American Chemical Society. – 1971. – Vol. 93 (6). – P. 1358–1362.

217. Gehring, K. A tetrameric DNA structure with protonated cytosine–cytosine base pairs / K. Gehring, J. L. Leroy, M. Guéron // Nature. – 1993. – Vol. 363 (6429). – P. 561–565.

218. Zikich, D. I–Motif Nanospheres: Unusual Self–Assembly of Long Cytosine Strands / D. Zikich [et al.] // Small. – 2011. – Vol. 7. – P. 1029–1034.

219. Khan, N. Solution equilibria of the i–motif–forming region upstream of the B–cell lymphoma–2 P1 promoter / N. Khan [et al.] // Biochimie. – 2007. – Vol. 89 (12). – P. 1562–1572.

220. Antao, V. P. CD Spectral Comparisons of the Acid–Induced Structures of Poly [d (A)] Poly [r (A)], Poly [d (C)], and Poly [r (C)] / V. P. Antao, D. M. Gray // Journal of Biomolecular Structure and Dynamics. – 1993. – Vol. 10 (5). – P. 819–839.

221. Holm, A. I. S. Electronic coupling between cytosine bases in DNA single strands and i–motifs revealed from synchrotron radiation circular dichroism experiments / A. I. S. Holm [et al.] // Physical Chemistry Chemical Physics. – 2010. – Vol. 12 (14). – P. 3426–3430.

222. Phan, A. T. The solution structure and internal motions of a fragment of the cytidine–rich strand of the human telomere / A. T. Phan, M. Guéron, J. L. Leroy // Journal of molecular biology. – 2000. – Vol. 299 (1). – P. 123–144.

223. Beenken, W. J. D. Spectroscopic units in conjugated polymers: a quantum chemically founded concept? / W. J. D. Beenken, T. Pullerits // The Journal of Physical Chemistry B. – 2004. – Vol. 108 (20). – P. 6164–6169.

224. Pollum, M. Photochemistry of Nucleic Acid Bases and Their Thio– and Aza–Analogues in Solution / M. Pollum, L. Martínez–Fernández, C. E. Crespo–Hernández // Photoinduced Phenomena in Nucleic Acids I / Eds. M. Barbatti, A. C. Borin, S. Ullrich. – Springer International Publishing, 2014. – 355 p. – P. 245–327.

225. Nielsen, L. M. Electronic coupling between photo–excited stacked bases in DNA and RNA strands with emphasis on the bright states initially populated / L. M. Nielsen, S. V. Hoffmann, S. B. Nielsen // Photochem. Photobiol. Sci. – 2013. – Vol. 12. – P. 1273.

226. Fujii, T. Structure and Dynamics of Electron Injection and Charge Recombination in i–Motif DNA Conjugates / T. Fujii [et al.] // J. Phys. Chem. B. – 2017. – Vol. 121. – P. 8058–8068.

227. Thazhathveetil, A. K. Efficient Charge Transport via DNA G–Quadruplexes / A. K. Thazhathveetil [et al.] // J. Am. Chem. Soc. – 2017. – Vol. 139. – .P. 1730–1733.

228. Zeraati, M. I–motif DNA structures are formed in the nuclei of human cells / M. Zeraati [et al.] // Nat. Chem. – 2018. – Vol. 10. – P. 631–637.

229. Dong, Y. DNA Nanotechnology Based on i–Motif Structures / Y. Dong, Z. Yang, D. Liu // Acc. Chem. Res. – 2014. – Vol. 47. – P. 1853–1860.

230. Ravanat, J.–L. Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components / J.–L. Ravanat, T. Douki, J. Cadet // J. Photochem. Photobiol. B. – 2001. – Vol. 63. – P. 88–102.

231. Douki, T. Effect of denaturation on the photochemistry of pyrimidine bases in isolated DNA / T. Douki // J. Photochem. Photobiol. B. – 2006. – Vol. 82. – P. 45–52.

232. Callis, P. R. Electronic States and Luminescence of Nucleic Acid Systems / P. R. Callis // Annu. Rev. Phys. Chem. – 1983. – Vol. 34. – P. 329–357.

233. Cohen, B. Ultrafast excited–state dynamics of RNA and DNA C tracts / B. Cohen, M. H. Larson, B. Kohler // Chem. Phys. – 2008. – Vol. 350. – P. 165–174.

234. Keane, P. M. Long–lived excited states in i–motif DNA studied by picosecond time–resolved IR spectroscopy / P. M. Keane [et al.] // Chem Commun. – 2014. – Vol. 50. – P. 2990–2992.

235. Keane, P. M. Long–Lived Excited–State Dynamics of i–Motif Structures Probed by Time–Resolved Infrared Spectroscopy / P. M. Keane [et al.] // ChemPhysChem. – 2016. – Vol. 17. – P. 1281–1287.

236. Birks, J. B. Photophysics of Aromatic Molecules / J. B. Birks. – Wiley-Interscience, 1970.

237. Olaso–González, G. The Role of Adenine Excimers in the Photophysics of Oligonucleotides / G. Olaso–González, M. Merchán, L. Serrano–Andrés // J. Am. Chem. Soc. – 2009. – Vol. 131. – P. 4368–4377.

238. Serrano–Pérez, J. J. Theoretical Insight into the Intrinsic Ultrafast Formation of Cyclobutane Pyrimidine Dimers in UV–Irradiated DNA: Thymine versus Cytosine / J. J. Serrano–Pérez [et al.] // J. Phys. Chem. B. – 2008. – Vol. 112. – P. 14096–14098.

239. Plessow, R. Intrinsic Time– and Wavelength–Resolved Fluorescence of Oligonucleotides: A Systematic Investigation Using a Novel Picosecond Laser Approach / R. Plessow [et al.] // J. Phys. Chem. B. – 2000. – Vol. 104. – P. 3695–3704.

240. Borrego–Varillas, R. Exciton Trapping Dynamics in DNA Multimers / R. Borrego–Varillas, G. Cerullo, D. Markovitsi // J. Phys. Chem. Lett. – 2019. – Vol. 10. – P. 1639–1643.

241. Georghiou, S. Singlet–singlet energy transfer along the helix of a double–

stranded nucleic acid at room temperature / S. Georghiou [et al.] // J. Biomol. Struct. Dyn. – 1990. – Vol. 8. – P. 657–674.

242. Fredericq, E. Study of the interaction of DNA and acridine orange by various optical methods / E. Fredericq, C. Houssier // Biopolymers. – 1972. – Vol. 11. – P. 2281–2308.

243. Armstrong, R.W. The interaction between acridine dyes and deoxyribonucleic acid / R.W. Armstrong, T. Kurucsev, U.P. Strauss // J. Am. Chem. Soc. – 1970. – Vol. 92. – P. 3174–3181.

244. Robinson, B.H. Thermodynamic behaviour of acridine orange in solution. Model system for studying stacking and charge–effects on self–aggregation / B.H. Robinson, A. Löffler, and G. Schwarz // J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1 Phys. Chem. Condens. Phases. – 1973. – Vol. 69. – P. 56–69.

245. Bonačić–Koutecký, V. An accurate relativistic effective core potential for excited states of Ag atom: An application for studying the absorption spectra of Ag n and Ag n+ clusters / V. Bonačić–Koutecký [et al.] // The Journal of chemical physics. – 1999. – Vol. 110 (8). – P. 3876–3886.

246. Díez, I. On heterogeneity in fluorescent few–atom silver nanoclusters / I. Díez [et al.] // Physical Chemistry Chemical Physics. – 2013. – Vol. 15 (3). – P. 979–985.

247. Richards, C. I. Oligonucleotide–stabilized Ag nanocluster fluorophores / C. I. Richards [et al.] // Journal of the American Chemical Society. – 2008. – Vol. 130 (15). – P. 5038–5039.

248. Shah, P. Design aspects of bright red emissive silver nanoclusters/DNA probes for microRNA detection / P. Shah [et al.] // Acs Nano. – 2012. – Vol. 6 (10). – P. 8803–8814.

249. Ritchie, C. M. Ag nanocluster formation using a cytosine oligonucleotide template / C. M. Ritchie [et al.] // The Journal of Physical Chemistry C. – 2007. – Vol. 111 (1). – P. 175–181.

250. Karimova, N. V. Time–dependent density functional theory investigation of the electronic structure and chiroptical properties of curved and helical silver nanowires / N. V. Karimova, C. M. Aikens // The Journal of Physical Chemistry A. – 2015. – Vol. 119

(29). – P. 8163–8173.

251. Vdovichev, A. A. Structural model of gold and silver fluorescent clusters / A. A. Vdovichev, R. R. Ramazanov, A. I. Kononov // Computer Research and Modeling. – 2015. – Vol. 7 (2). – P. 263–269.

252. Kummer, K. Electronic structure of genomic DNA: A photoemission and X–ray absorption study / K. Kummer [et al.] // The Journal of Physical Chemistry B. – 2010. – Vol. 114 (29). – P. 9645–9652.

253. Daune, M. Complexes of silver ion with natural and synthetic polynucleotides / M. Daune, C. A. Dekker, H. K. Schachman // Biopolymers: Original Research on Biomolecules. – 1966. – Vol. 4 (1). – P. 51–76.

254. Shukla, S. Probing differential Ag+–nucleobase interactions with isothermal titration calorimetry (ITC): Towards patterned DNA metallization / S. Shukla, M. Sastry // Nanoscale. – 2009. – Vol. 1 (1). – P. 122–127.

255. Li, W. Effects of polymorphic DNA on the fluorescent properties of silver nanoclusters / W. Li [et al.] // Photochemical & Photobiological Sciences. – 2013. – Vol. 12 (10). – P. 1864–1872.

256. Yamane, T. On the complexing of deoxyribonucleic acid by silver (I) / T. Yamane, N. Davidson // Biochimica et biophysica acta. – 1962. – Vol. 55 (5). – P. 609–621.

257. Widengren, J. Fluorescence–based transient state monitoring for biomolecular spectroscopy and imaging / J. Widengren // Journal of The Royal Society Interface. – 2010. – Vol. 7 (49). – P. 1135−1144.

258. Richards, C. I. Optically modulated fluorophores for selective fluorescence signal recovery / C. I. Richards [et al.] // J. Amer. Chem. Soc. – 2009. – Vol. 131 (13). – P. 4619–4621.

259. Petty, J. T. DNA–templated molecular silver fluorophores / J. T. Petty [et al.] // J. Phys. Chem. Lett. – 2013. – Vol. 4. – P. 1148−1155.

260. Birge, R. R. Kodak laser dyes / R. R. Birge [et al.] – Eastman Kodak Company, Rochester, NY, 1987.

261. Stracke, F. Singlet molecular oxygen photosensitized by Rhodamine dyes: correlation with photophysical properties of the sensitizers / F. Stracke, M. Heupel, E. Thiel // J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry. – 1999. – Vol. 126 (1–3). – P. 51–58.

262. Gregor, I. Precise fluorescence measurement for determination of photophysical properties of dyes / I. Gregor, M. Heupel, E. Thiel // Chem. Phys. – 2001. – Vol. 272 (2–3). – P. 185–197.

263. Gazeau, M. C. New experimental method for determining the S1→ Sn absorption spectrum of highly fluorescent dyes / M. C. Gazeau [et al.] // Canadian journal of physics. – 1993. – Vol. 71 (1–2). – P. 59–65.

264. Eggeling, C. Molecular Photobleaching Kinetics of Rhodamine 6G by One– and Two–Photon Induced Confocal Fluorescence Microscopy / C. Eggeling, A. Volkmer, C. A. M. Seidel // ChemPhysChem. – 2005. – Vol. 6. – P. 791–804.

265. Eggeling, C. Photobleaching of Fluorescent Dyes under Conditions Used for Single–Molecule Detection: Evidence of Two–Step Photolysis / C. Eggeling [et al.] // Anal. Chem. – 1998. – Vol. 70. – P. 2651–2659.

266. Reindl, S. Higher Excited–State Triplet–Singlet Intersystem Crossing of Some Organic Dyes / S. Reindl, A. Penzkofer // Chem. Phys. – 1996. – Vol. 211. – P. 431–439.

267. Kibbe, W. A. OligoCalc: An online oligonucleotide properties calculator / W. A. Kibbe // Nucleic Acids Res. – 2007. – vol. 35. – P. W43–W46.

268. Gwinn, E. DNA–Protected Silver Clusters for Nanophotonics / E. Gwinn [et al.] // Nanomaterials. – 2015. – Vol. 5. – P. 180–207.

269. Leggett, A. J. Dynamics of the dissipative two–state system / A. J. Leggett [et al.] // Rev. Mod. Phys. – 1987. – Vol. 59. – P. 1–85.

270. Czader, A. Calculations of the exciton coupling elements between the DNA bases using the transition density cube method / A. Czader, E. R. Bittner // J. Chem. Phys. – 2008. – Vol. 128. – P. 35101.

271. Lakowicz, J. R. Principles of Fluorescence Spectroscopy / J. R. Lakowicz. – 3rd edn. – Springer International Publishing, 2006.