

Wybrane Zagadnienia Biofizyki Molekularnej

(1100-5BM15)

Jan M. Antosiewicz

**Zakład Biofizyki
Instytut Fizyki Doświadczalnej
Wydział Fizyki**

WKŁAD 5

22 października, 2024

**Błądzenie losowe w procesach biomolekularnych
(część 4)**

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

jantosi@fuw.edu.pl

1967: pierwsze badania mające na celu wykazanie, że białka mają zdolność wiązania się ze specyficznymi sekwencjami DNA.

Otto G. Berg, Robert B. Winter, and Peter H. von Hippel, Diffusion-Driven Mechanisms of Protein Translocation on Nucleic Acids, Biochemistry vol. 20, 1981, part 1 pp 6929-6948, part 2 pp 6948-6960, part 3 pp 6961-6977

The Journal of Biological Chemistry, 264:675-678 (1989)

Peter H. von Hippel and Otto G. Berg

Minireview: Facilitated Target Location in Biological Systems

W 1970 roku Riggs i wsp.* podali, że represor lac w *Escherichia coli*, wiążący się z DNA λ in vitro (50 kb) zdawał się znajdować swoje miejsce docelowe (operator) w DNA z szybkością aż 1000-krotnie większą ($7 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) niż górna granica oszacowana dla proces kontrolowany dyfuzją z udziałem makrocząsteczek tej wielkości. Ta obserwacja zaskoczyła i zaintrygowała wielu biologów molekularnych i biochemików zajmujących się fizyką, a także zapoczątkowała lawinę artykułów teoretycznych i eksperymentalnych mających na celu wyjaśnienie tej możliwości.**

*Riggs, A.D., Bourgeois, S. and Cohn, M., The lac repressor-operator interaction. 3. Kinetic studies. J. Mol. Biol. 53:401-417 (1970)

**Represor lac (LacI) to białko wiążące się to DNA, które po przyłączeniu się do DNA hamuje ekspresję genów kodujących białka biorące udział w metabolizmie laktozy u tej bakterii (wikipedia).

Co ogranicza szybkość reakcji?

Szybkość reakcji biologicznych, podobnie jak zwykłych procesów chemicznych, jest w zasadzie ograniczona szybkością, z jaką dyfuzja może zbliżyć reagenty do siebie. Zatem maksymalna szybkość reakcji zależy od szybkości tworzenia kompleksów spotkaniowych przez molekuly uczestniczące w reakcji, co dla bimolekularnego połączenia dwóch równomiernie reaktywnych cząsteczek kulistych (A i B) odpowiada granicy Smoluchowskiego [in $M^{-1} s^{-1}$]

$$k_{encounter} = 4 \pi (D_A + D_B) (r_A + r_B) N_A / 1000$$

Rzeczywiste szybkości asocjacji lub reakcji molekularnych odbiegają zwykle od szybkości przewidywanych dla cząsteczek o ekwiwalentnych rozmiarach, przewidywanych na podstawie prostej zależności Smoluchowskiego, z wielu powodów:

- (i) całe powierzchnie cząsteczek nie są na ogół jednolicie reaktywne;
- (ii) mogą istnieć elektrostatyczne siły przyciągające lub odpychające, które albo zwiększają, albo zmniejszają szybkość asocjacji prostej poprzez dyfuzję;
- (iii) cząstki reaktywne mogą nie być kuliste (asymetria molekularna zazwyczaj zmniejsza szybkość dyfuzji);
- (iv) odległość oddziaływania może różnić się od sumy promieni hydrodynamicznych oddziałujących cząstek.

Aspekty te skutkują zmodyfikowanym równaniem Smoluchowskiego,

$$k_{assoc} = 4 \pi \kappa a f (D_A + D_B) N_A / 1000$$

gdzie κ jest bezwymiarowym parametrem interakcji określonym przez ułamki powierzchni cząstek A i B, które są reaktywne, a jest odległością interakcji (w cm), f jest bezwymiarowym współczynnikiem odzwierciedlającym wzrost lub spadek częstości zderzeń dyfuzyjnych w wyniku elektrostatycznego przyciągania lub odpychania oddziałujących cząsteczek, a D_A i D_B są rzeczywistymi stałymi dyfuzji oddziałujących cząstek (zazwyczaj niesferycznych).

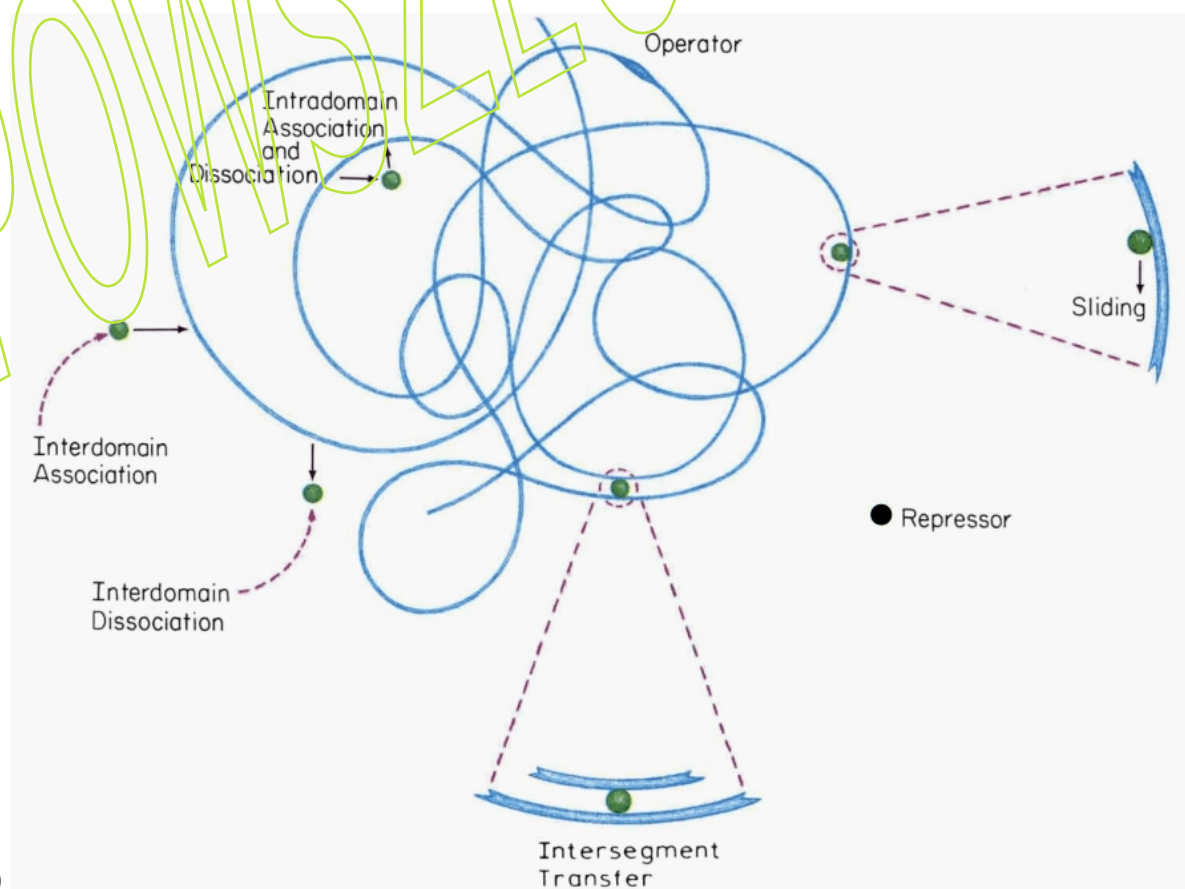
Używając rozsądnych szacunków parametrów powyższego równania, okazuje się, że oddziaływanie represora lac z jego celem operatorowym w dużej cząsteczce DNA wynosi w przybliżeniu $10^8 M^{-1} s^{-1}$. Dla kontrastu Riggs i in. zmierzili, a inni potwierdzili, że k_{assoc} dla oddziaływania represora lac z jego docelowym operatorowym miejscem na cząsteczce DNA faga λ (50 000 par zasad) może wynosić do $5 \times 10^{10} M^{-1} s^{-1}$.

Specjalne cechy oddziaływania DNA-białko: Nieswoiste wiązanie przyspiesza lokalizację celu na DNA

Wydaje się, że tworzenie kompleksów pośrednich pomiędzy niespecyficznymi miejscami wiązania na DNA a przychodzącym białkiem regulatorowym przyspiesza lokalizację celu. Jak to możliwe? Rysunek poniżej sugeruje dwa ogólne sposoby tworzenia niespecyficznego kompleksu, które mogą w zasadzie zwiększyć szybkość lokalizacji docelowej sekwencji DNA. Nazwalimy te dwa mechanizmy „ślizganiem” i „przenoszeniem międzysegmentowym”. Obydwa obejmują dyfuzję białka w stanie związania niespecyficznego, a zatem skutecznie zmniejszają objętość obszaru, który musi być „przeszukiwany przez białko w celu znalezienia jego regulatorowego celu na DNA”. Ślizganie zostało po raz pierwszy zaproponowane w sposób ogólny przez Adama i Delbrucka jako mechanizm ułatwiający lokalizację celu dyfuzyjnego.

Schematyczny widok represora łańcuch oddziałującego, w rozcieńczonym roztworze, z dużą cząsteczką DNA zawierającą miejsce operatorowe. (Góra) powiększony widok związania represora z segmentem nieoperatorowego DNA, po którym może się on „ślizgać” lub angażować się w procesy dysocjacji wewnątrz domeny w poszukiwaniu swojego specyficznego (operatorowego) miejsca docelowego.

Widok powiększony (dolny) przedstawia cząsteczkę represora podwójnie związaną z dwoma segmentami DNA; odpowiada to stanowi pośredniemu w procesie transferu międzysegmentowego.



Specjalne cechy oddziaływania DNA-białko: Ślizganie się białek po DNA

Proces ślizgania się białka po DNA można postrzegać jako formę „jednowymiarowej” dyfuzji białka wzdłuż konturu DNA. Aby proces ten zadziałał, wymagana jest aby bariera aktywacyjna dla translacji białka wzdłuż DNA w stanie niespecyficznym była mała w porównaniu z energiami cieplnymi (kT ; 0,6 kcal/mol w temperaturach fizjologicznych). Wymaga to stosunkowo zdelokalizowanego typu wiązania białek z DNA; Wydaje się, że oddziaływania ładunek-ładunek zapewniają odpowiednią energię swobodną wiązania spełniającą ten warunek.

Stephen E. Halford, *An end to 40 years of mistakes in DNA–protein association kinetics?* Biochem. Soc. Trans. 37:343-348 (2009)

Białka, które wiążą się ze specyficznymi sekwencjami w długich cząsteczkach DNA, muszą zlokalizować swoje miejsca docelowe wśród niezliczonych alternatywnych sekwencji i robią to z zadziwiająco dużą szybkością, czasami sięgającą $10^{10} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. W związku z tym utrwalił się powszechny pogląd, że wiązanie z określonymi miejscami DNA może przekroczyć maksymalną szybkość dyfuzji 3D (trójwymiarowej) przez roztwór i że można to wytłumaczyć jedynie zmniejszeniem w wymiarowości poszukiwania celu poprzez jednowymiarową dyfuzję (lub „ślizganie się”) wzdłuż konturu DNA.

Pokażemy tutaj, że w rzeczywistości nie jest znany przykład wiązania białka z określonym miejscem DNA z szybkością przekraczającą granicę dyfuzji i że szybkość tych reakcji wynika głównie z oddziaływań elektrostatycznych pomiędzy przeciwnie naładowanymi cząsteczkami.

Zostanie również pokazane, że wbrew powszechnemu przekonaniu, zmniejszona wymiarowość generalnie nie zwiększa szybkości lokalizacji specyficznego miejsca docelowego, ale wręcz przeciwnie, zmniejsza ją.

Na koniec zostanie wykazane, że białka lokalizują swoje miejsca docelowe głównie poprzez wielokrotne zdarzenia dysocjacji/ponownej asocjacji z innymi (pobliskimi lub odległymi) miejscami w obrębie tej samej cząsteczki DNA oraz że dyfuzja 1D ogranicza się do lokalnych przeszukiwań obejmujących ~ 50 pz wokół każdego miejsca niespecyficznego wiązania.

Stephen E. Halford, *An end to 40 years of mistakes in DNA–protein association kinetics?* Biochem. Soc. Trans. 37:343-348 (2009)

Związanie białka oddziałującego ze specyficznym miejscem na DNA, w miejscu docelowym już na samym początku, po dyfuzji w roztworze, jest bardzo mało prawdopodobne dlatego, że miejsce docelowe (zwykle 15–20 pz dla represorów, ale tylko 4–6 pz dla enzymów restrykcyjnych) stanowi tylko niewielki ułamek całkowitej długości DNA. Zamiast tego początkowa kolizja z DNA najprawdopodobniej nastąpi w losowym, nieswoistym miejscu, a następnie białko musi przenieść się do określonego miejsca drogą wewnątrzcząsteczkową, co jest procesem określanym jako „ułatwiona dyfuzja”. Istnieją co najmniej trzy możliwości takiego przejścia.

Jedną z możliwości, zwaną „ślizganiem się”, jest dyfuzja 1D (jednowymiarowa) wzdłuż DNA, podążająca za jego konturem, pozostając w ciągłym kontakcie z DNA.

Inną możliwością są wielokrotne dysocjacje i ponowne asocjacje. Jest to nadal głównie proces wewnątrzcząsteczkowy, ponieważ średnia odległość między cząsteczkami DNA w rozcieńczonym roztworze jest znacznie większa niż odległość między dowolnymi dwoma miejscami w tym samym łańcuchu DNA, biorąc pod uwagę, że DNA będzie naturalnie mieć konfigurację statystycznego kłębka lub konfigurację superzwoju. W związku z tym prawdopodobieństwo ponownego powiązania jest znacznie większe w tym samym łańcuchu niż w innej cząsteczce DNA. Jeśli białko łączy się ponownie w pobliżu miejsca, z którego się oddzieliło, nazywa się to „przeskakiwaniem”, natomiast jeśli łączy się ponownie w odległym miejscu wzdłuż konturu DNA (ale które nadal może znajdować się blisko punktu wyjścia w przestrzeni 3D), nazywa się to „skokiem”. Próg pomiędzy przeskakiwaniem a skokami jest całkowicie dowolny, chociaż kroki < 10 pz są zwykle uważane za przeskoki, a te o > 100 pz za skoki.

W trzeciej możliwości, transferze międzysegmentowym, białko związane z jednym miejscem DNA przenosi się do innego poprzez przejściowe, jednoczesne związanie z obydwojema fragmentami. Proces ten ma zastosowanie tylko do białek z dwiema powierzchniami wiążącymi DNA, takich jak sam represor Lac.

Stephen E. Halford, *An end to 40 years of mistakes in DNA–protein association kinetics?* Biochem. Soc. Trans. 37:343-348 (2009)

Pierwsza wartość uzyskana dla stałej szybkości oddziaływania represor-operator Lac, $7 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, pochodziła z reakcji prowadzonych przy bardzo niskiej sile jonowej, w buforze zawierający tylko Tris/HCl, KCl i octan magnezu, wszystkie w stężeniu 10 mM. Zmniejszenie stężeń tych składników doprowadziło do jeszcze szybszego tempa asocjacji, podczas gdy zwiększenie KCl do 100 mM spowodowało 100-krotny spadek szybkości. Dlatego też w tych wczesnych badaniach zaproponowano, co następuje: „Powodem niezwykle dużej szybkości reakcji jest prawie na pewno fakt, że istnieje przyciąganie elektrostatyczne pomiędzy dodatnio naładowanymi miejscami na represorze i ujemnie naładowanymi grupami fosforanowymi w operatorze”.

Obecnie nie znane jest żadne białko wiążące się z określonym miejscem DNA, które robiłoby to z szybkością przekraczającą granicę wyznaczoną przez dyfuzję. Natomiast większość białek wiążących się do specyficznych sekwencji DNA, robi to z szybkością zbliżoną do limitu dyfuzyjnego dla odpowiednich warunków eksperymentalnych. To z kolei oznacza, że etapem decydującym o szybkości wiązania się z określonym miejscem DNA będzie na ogół dyfuzja białka do cząsteczki DNA, gdzie początkowo napotka ono niespecyficzne miejsce, oraz że późniejszy transfer z początkowego niespecyficznego miejsca specyficzne dla ostatecznego konkretnego miejsca rzadko decyduje o szybkości.

Stephen E. Halford, *An end to 40 years of mistakes in DNA-protein association kinetics?* Biochem. Soc. Trans. 37:343-348 (2009)

Jaka dyfuzja jest najszybszą drogą do celu, 1D czy 3D?

Zaskakującą cechą asocjacji DNA-białko nie jest to, że często są one szybkie, ale raczej to, że nie są niewiarygodnie powolne: jeśli białko miałoby wielokrotnie wymieniać się między otaczającym roztworem (poza domeną cząsteczki DNA) a przypadkowymi miejscami na DNA, a miejsce specyficzne stanowiłoby jedną część na 10^4 części całkowitej długości DNA, wówczas prawdopodobieństwo zderzenia z celem wynosi 10^{-4} , co z kolei powinno skutkować stałą szybkości asocjacji 10^4 razy niższą niż granica dyfuzji. Powstaje zatem pytanie, jaki jest charakter transferu wewnątrzcząsteczkowego z miejsc nieswoistych do specyficznych, z szybkością wystarczająco dużą, aby nie wpływać na ogólną szybkość wiązania.

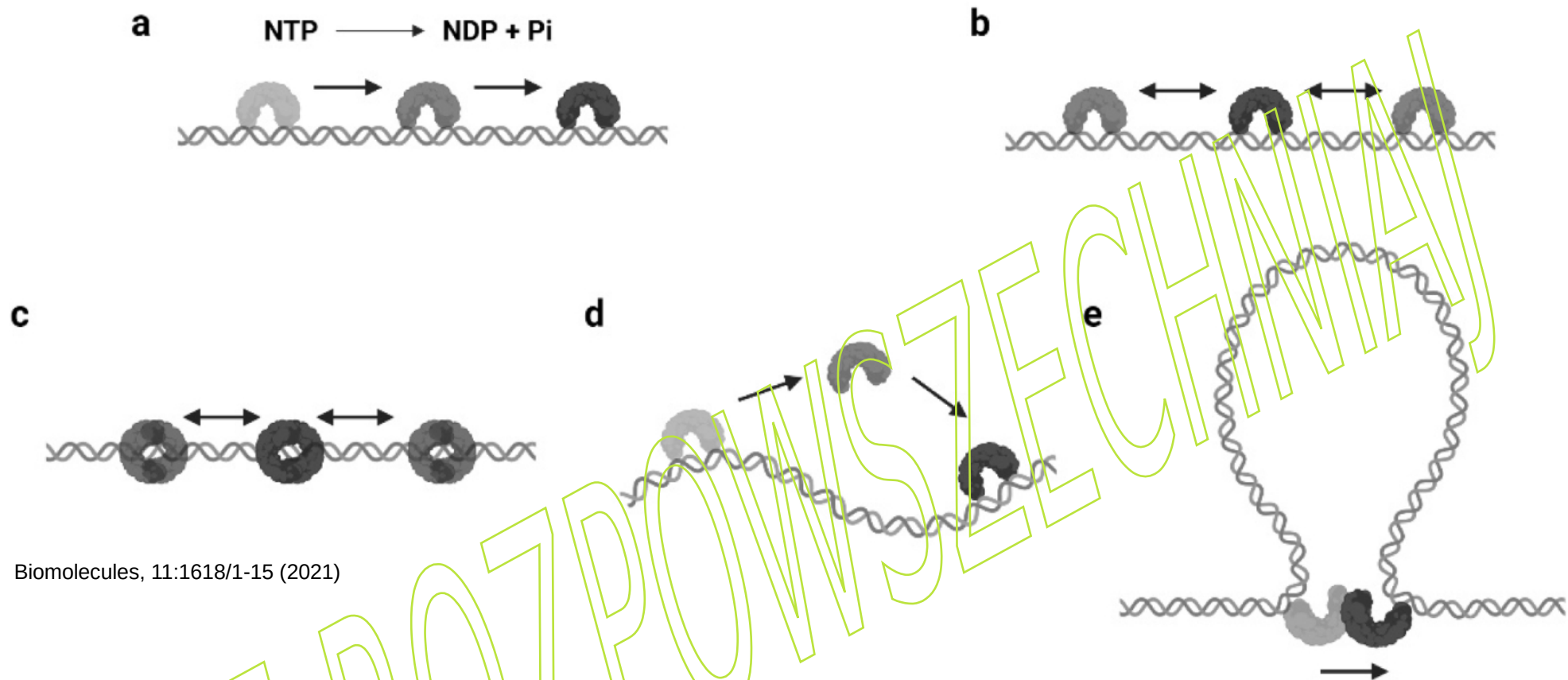
W dyfuzji 1D, po każdym etapie, prawdopodobieństwo, że następny krok będzie w kierunku celu, jest dokładnie równe prawdopodobieństwu, że następny krok będzie w kierunku przeciwnym, w wyniku czego średnia pozycja białka nigdy nie różni się od punktu początkowego. Dystrybucja wokół średniej będzie się poszerzać z czasem, chociaż odchylenie o N bp od średniej wymaga w sumie N^2 pojedynczych kroków bp. Co więcej, po każdym etapie białko może oddzielić się od DNA, tak że prawdopodobieństwo pozostania białka w DNA przez N etapów (P_N) jest określone wzorem

$$P_N = \left(\frac{k_s}{k_s + k_{off}} \right)^N$$

gdzie k_s stałą szybkości przemieszczania się o 1 pz wzdłuż DNA, k_{off} jest stałą szybkości dysocjacji. Dla $k_s:k_{off} = 10000:1$, co jest najprawdopodobniej zbyt dużym oszacowaniem tego stosunku, 99.8% molekuł białka oddysocjuje od DNA przez przemieszczeniem się o 250 pz. Zatem wydaje się, że panuje ogólna zgoda co do tego, że szybkość znajdowania miejsca docelowego na DNA jest zoptymalizowana przez połączenie dyfuzji w 1D i 3D.

Xiao-Wen Yang and Jiaquan Liu, *Observing Protein One-Dimensional Sliding: Methodology and Biological Significance*, Biomolecules, 11:1618 (2021)

Koncepcja jednowymiarowego ślizgania się białek po DNA (1D sliding) jest znana od kilkudziesięciu lat. Polimerazy i helikazy DNA/RNA działające jeden nukleotyd za drugim to wczesne przykłady, które oczywiście muszą poruszać się w 1D wzdłuż nici DNA. Dalsze badania wykazały, że wiele białek wiążących DNA specyficznych dla sekwencji, w tym wiele endonukleaz restrykcyjnych i czynników transkrypcyjnych, również ślizga się wzdłuż dwuniciowego DNA (dsDNA) w poszukiwaniu miejsc docelowych. Chociaż większość badań sprawdzała przesuwanie białek 1D przy użyciu stosunkowo prostych systemów, wiele skomplikowanych zagadnień biologicznych dotyczy składania kompleksów białkowych i wielu etapów reakcji, których nie można ocenić za pomocą tych systemów. W tej przeglądownce podsumowaliśmy najnowsze badania dotyczące ślizgania się białek w 1D. Przedstawiono kilka trybów poślizgu i związane z nimi metody pomiaru ruchu białek. Szczególnie interesujące jest to, że podkreślamy obserwacje, które ostatecznie ujawniły biologiczne znaczenie po DNA w 1D.



Biomolecules, 11:1618/1-15 (2021)

Tryby przesuwania białek po DNA w 1D.

- (a) Translokacja: białko przemieszcza się wzdłuż DNA w sposób jednokierunkowy poprzez hydrolizę NTP (NDP = difosforan nukleozydu; Pi = fosforan nieorganiczny).
- (b) Ułatwiona dyfuzja: białko biernie ślizga się po DNA w celu przeszukania celów po uprzednim związaniu z miejscem niespecyficznym.
- (c) Przesuwanie się jak zacisk: białko pierścieniowe biernie ślizga się po DNA z przerywanymi kontaktami z DNA.
- (d) Przeskakiwanie lub skakanie: białko dyfunduje na DNA w wyniku serii zdarzeń dysocjacji i ponownego wiązania.
- (e) Transfer międzysegmentowy: białko przemieszcza się z jednego miejsca wiązania do drugiego poprzez utworzenie przejściowej pętli DNA (represor lacI w fuzji z białkiem żółtej fluorescencji nie ma tej możliwości).

Struktury podwójnej helisy reprezentują dsDNA, a struktury łukowe lub pierścieniowe reprezentują białka wiążące DNA. Czarne strzałki wskazują kierunki ruchów białek w DNA.

W typowym eksperymencie śledzenia przemieszczania się pojedynczej cząsteczki białka po DNA, cząsteczka kwasu nukleinowego jest unieruchomiana i rozciągana

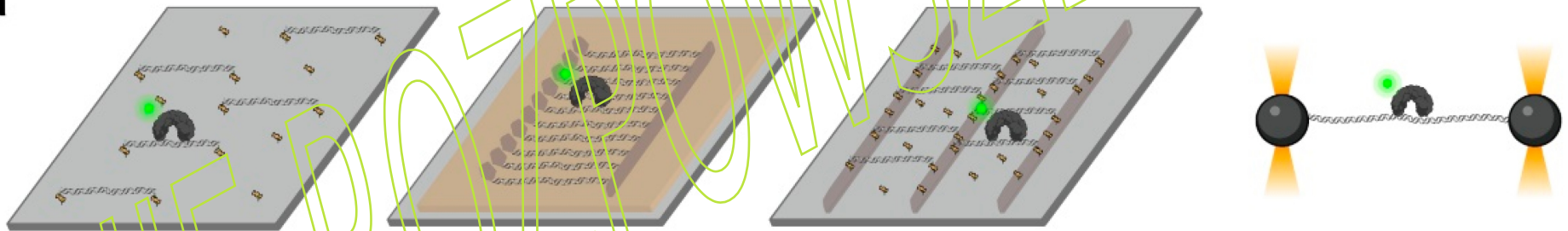
Unieruchomienie

- na powierzchni kwarcu, np. poprzez biotynę – neutrawidynę – biotynę;
- na dwuwarstwie lipidowej;
- szczypczykami optycznymi;

Rozciąganie

- przepływ laminarny buforu i łączenie obu końców rozciągniętej cząsteczki z powierzchnią;
- łączenie jednego końca z powierzchnią i rozciąganie w wyniku ciągłego przepływu laminarnego buforu;
- uniweuchomienie jednego koralika dielektrycznego szczypczyków optycznych (C-trap) i przesunięcie drugiego

a



(a) Cztery rodzaje metod immobilizacji DNA, w tym losowe unieruchomienie, kurtyny DNA (wykorzystuje się kombinację nanofabrykowanych wzorów powierzchniowych i płynnych dwuwarstw lipidowych w celu ułożenia obok siebie setek rozciągniętych cząsteczek DNA), mostki powietrzne DNA i szczypczyki optyczna typu C-trap (od lewej do prawej). Szare prostokąty reprezentują powierzchnie kwarcu, a żółty prostokąt reprezentuje dwuwarstwę lipidową. Czarne kule reprezentują koraliki dielektryczne. Pokazano białka znakowane fluoroforem (białka wiążące DNA z zielonymi barwnikami) na DNA.

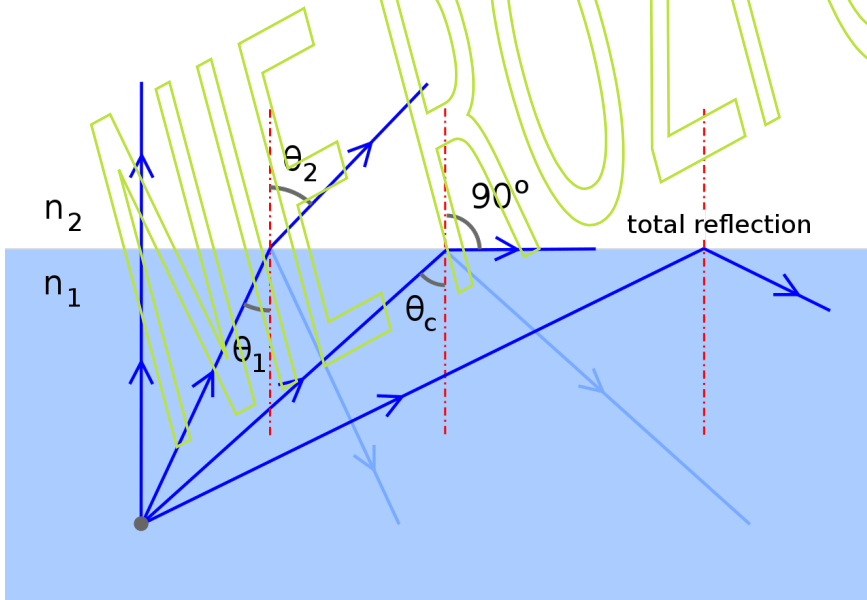
Do śledzenia przemieszczania się pojedynczych cząsteczek białek wykorzystuje się mikroskop konfokalny lub metodę fluorescencji całkowitego wewnętrznego odbicia (TIRF, od “total internal reflection fluorescence”).

Podjęcia do śledzenia pojedynczych cząsteczek w celu obserwacji przesuwania się białka 1D

1.

Śledzenie pojedynczych cząsteczek można uzyskać za pomocą mikroskopu TIRF. Mikroskop TIRF umożliwia oświetlenie cienkiego obszaru próbki ($\approx 100\text{--}300\text{ nm}$), co znacznie zwiększa stosunek sygnału do szumu podczas obrazowania. Do obrazowania fluoroforu często stosuje się komory przepływowe, składające się ze szkiełka kwarcowego, kawałka dwustronnej taśmy i szkiełka nakrywkowego, gdzie szkiełko kwarcowe zostało poddane działaniu odczynników chemicznych w celu wytworzenia glikolu polietylenowego (PEG)/biotyny - Powierzchnia pasywowana PEG. Do dostarczania buforów lub próbek poprzez kontrolowany przepływ laminarny zwykle wykorzystuje się napędzaną silnikiem pompę strzykawkową.

Biomolecules, 11:1618/1-15 (2021)

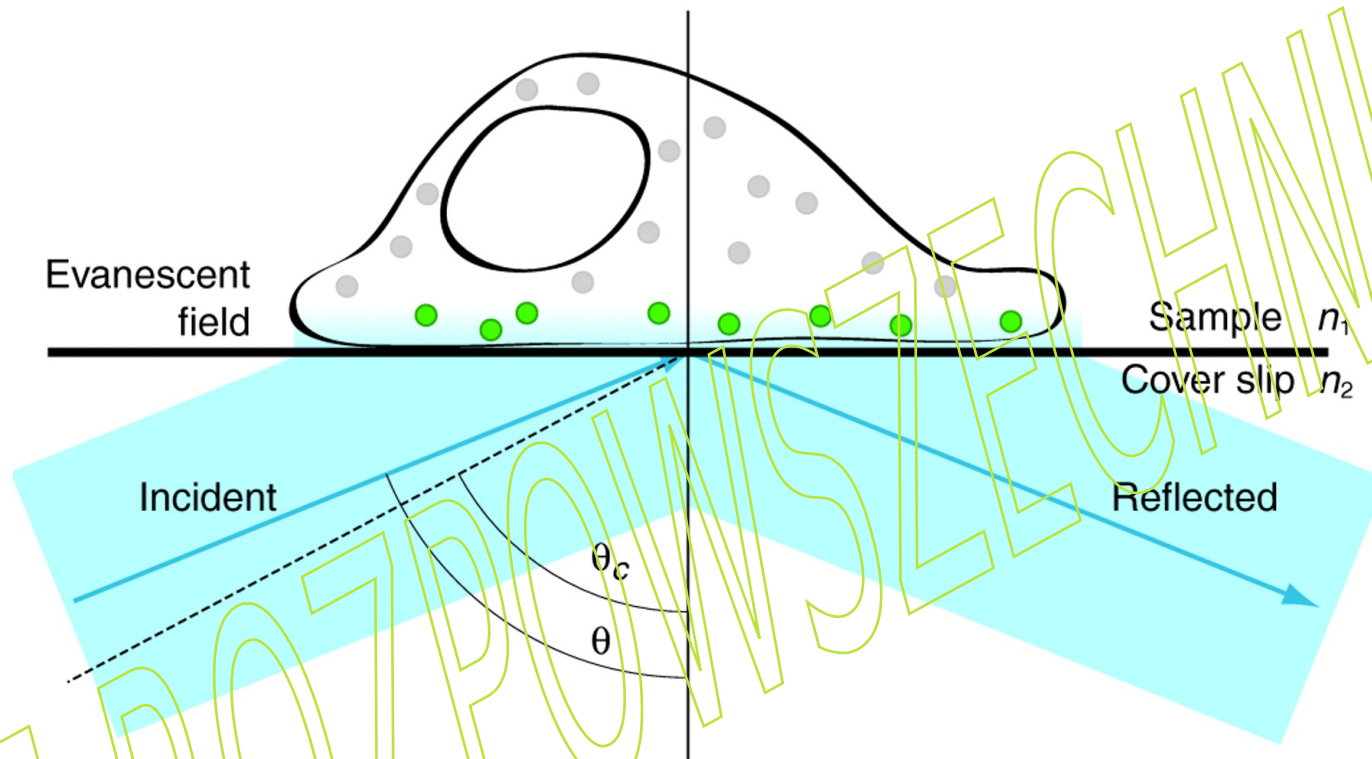


Całkowite wewnętrzne odbicie (TIR) to zjawisko optyczne, w którym fale docierające do granicy faz z jednego ośrodka do drugiego (np. z wody do powietrza) nie są załamane w drugim („zewnątrznym”) ośrodku, ale całkowicie odbijane z powrotem do pierwszego („wewnętrznego”) ośrodka”. Ma to miejsce, gdy w drugim ośrodku prędkość rozchodzenia się fali jest większa (niższy współczynnik załamania światła) niż w pierwszym ośrodku, a fale padają pod wystarczająco skośnym kątem na granicy faz.

$$n_1 \sin \theta_1 = n_2 \sin \theta_2; \quad \theta_c = \arcsin(n_2/n_1) \quad (n_1 > n_2)$$

Zachowanie się promienia padającego z ośrodka o większym współczynniku załamania n_1 do ośrodka o niższym współczynniku załamania n_2 , przy rosnących kątach padania.

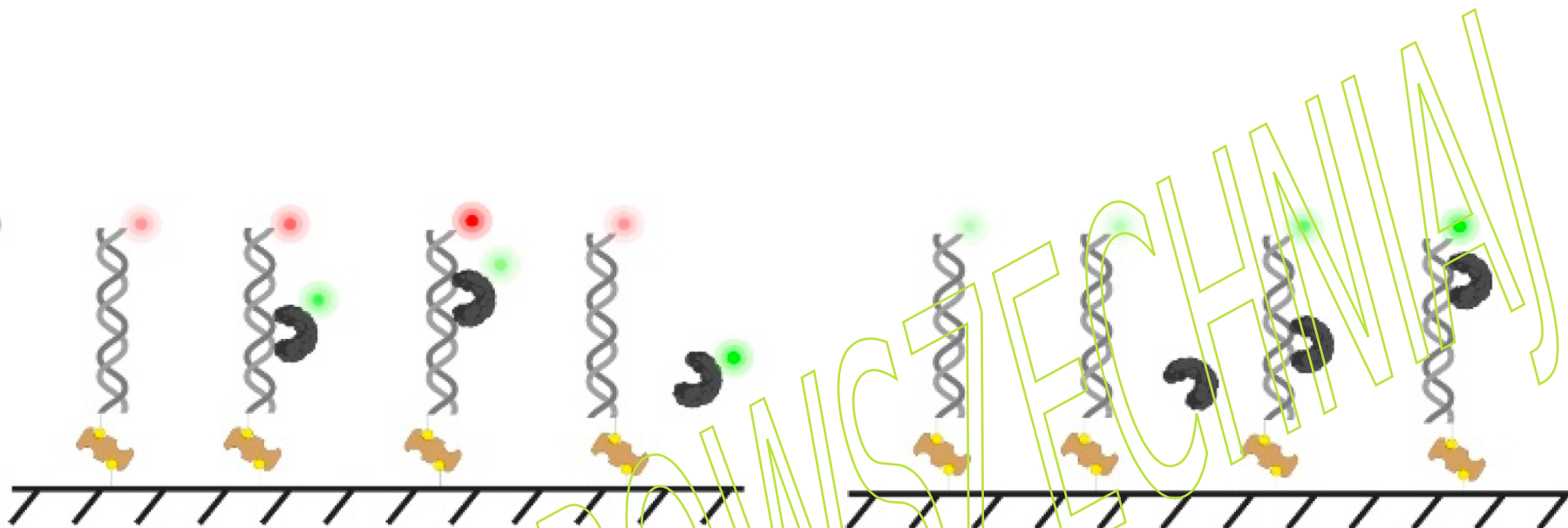
mikroskopia fluorescencyjna z całkowitym wewnętrznym odbiciem (TIRF)



Wiązka wzbudzenia wchodzi z lewej strony pod kątem padania θ , który jest większy niż kąt krytyczny θ_c (zaznaczony linią przerywaną). Kąty mierzone są od normalnej. Wiązka wzbudzenia odbija się od granicy między szkiełkiem nakrywkowym a próbką, a po przeciwnej stronie granicy faz, w próbce, generowane jest pole zanikające. Wzbudzone są tylko fluorofory w polu zanikającym, na co wskazuje zielony kolor. Aby osiągnąć TIR, współczynnik załamania próbki (n_1) musi być mniejszy niż współczynnik załamania szkiełka nakrywkowego (n_2).

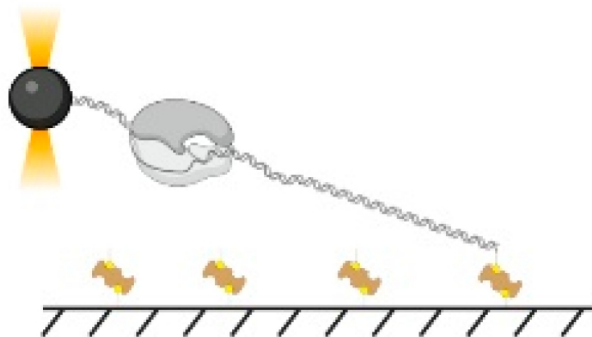
Natężenie (I) pola zanikającego maleje wykładniczo wraz z odległością od granicy faz (z). Dlatego fluorofor znajdujący się bliżej granicy faz będzie wzbudzany silniej niż fluorofor znajdujący się dalej od granicy faz.

2.

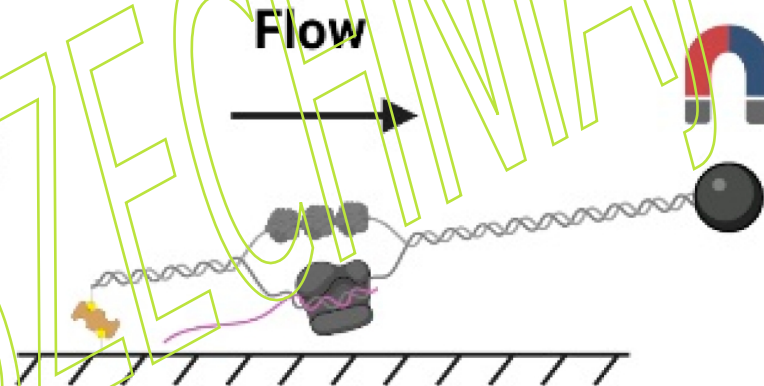
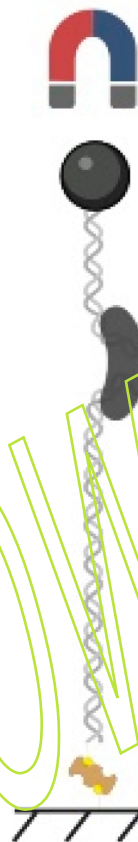


Ilustracja monitorowania odległości między DNA i białkiem przy użyciu rezonansowego transferu energii Förstera (FRET, po lewej) i wzmocnienia fluorescencji indukowanej białkiem (PIFE, po prawej). Substraty DNA znakowane fluoroforem unieruchomiono na powierzchniach szkła kwarcowego. Białka wiążące DNA ślizgają się po DNA i powodują FRET (po lewej) lub PIFE (po prawej).

3.



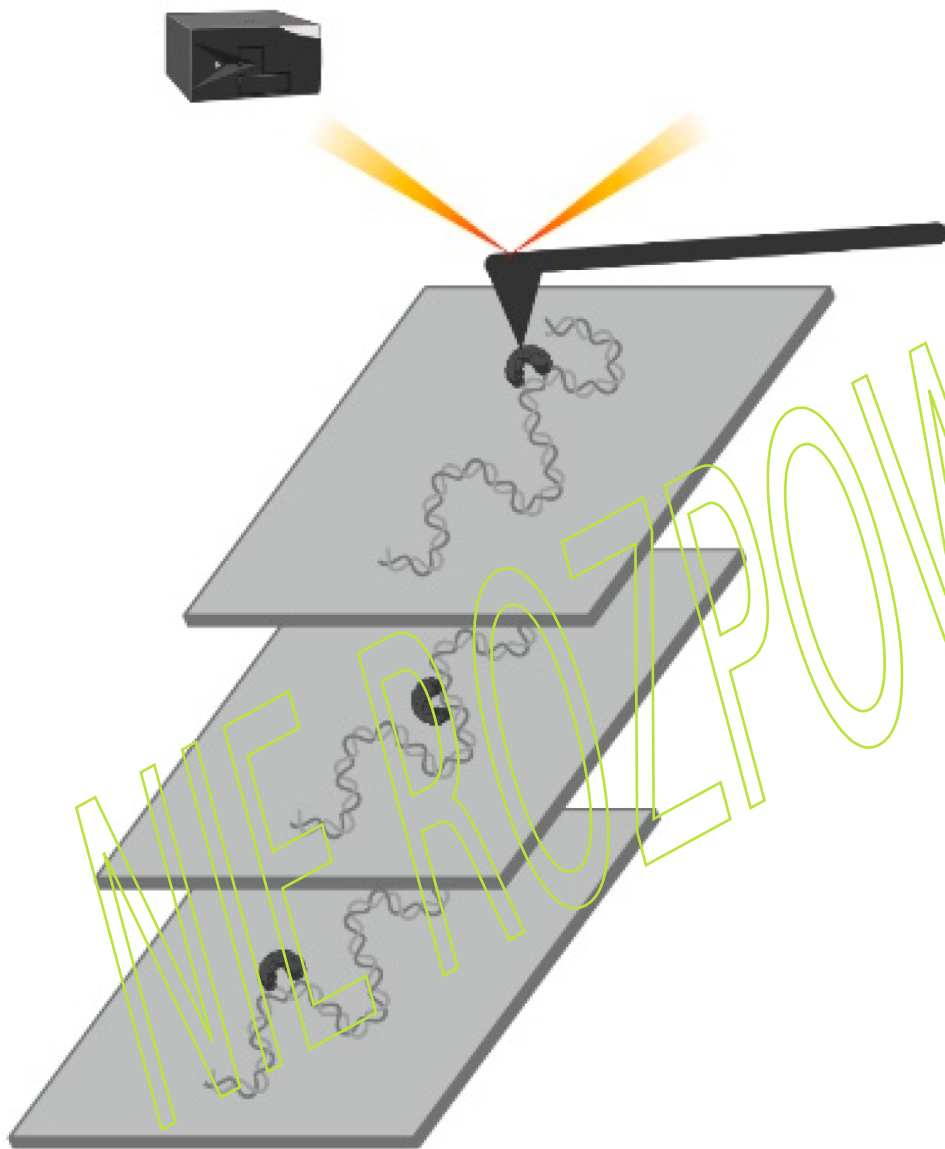
4.



(3.) Ilustracja wykrywania sił związanych z oddziaływaniami DNA-białko za pomocą szczypczyków optycznych. Pokazano trzy typy projektów eksperymentów, w tym test powierzchniowy, test oparty na hantlach wykorzystujący dwie pułapki optyczne do wiązania podwójnych końców DNA oraz test oparty na hantlach wykorzystujący dwie pułapki optyczne do wiązania odpowiednio końca DNA i białka (pokazane od góry do dołu). Czarne kule reprezentują koraliki dielektryczne.

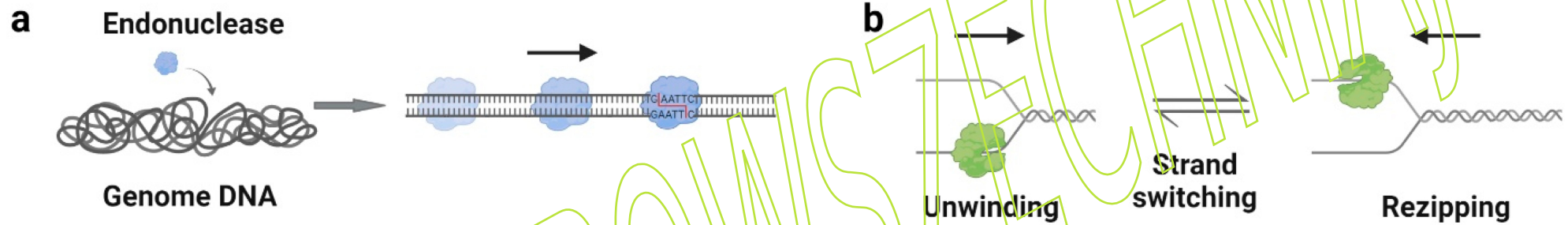
(4.) Ilustracja wykrywania sił związanych z oddziaływaniami DNA-białko za pomocą szczypczyków magnetycznych. Pokazano konfigurację ogólną (po lewej) i konfigurację rozciągającą (po prawej). Czarne kule reprezentują koraliki superparamagnetyczne.

5.

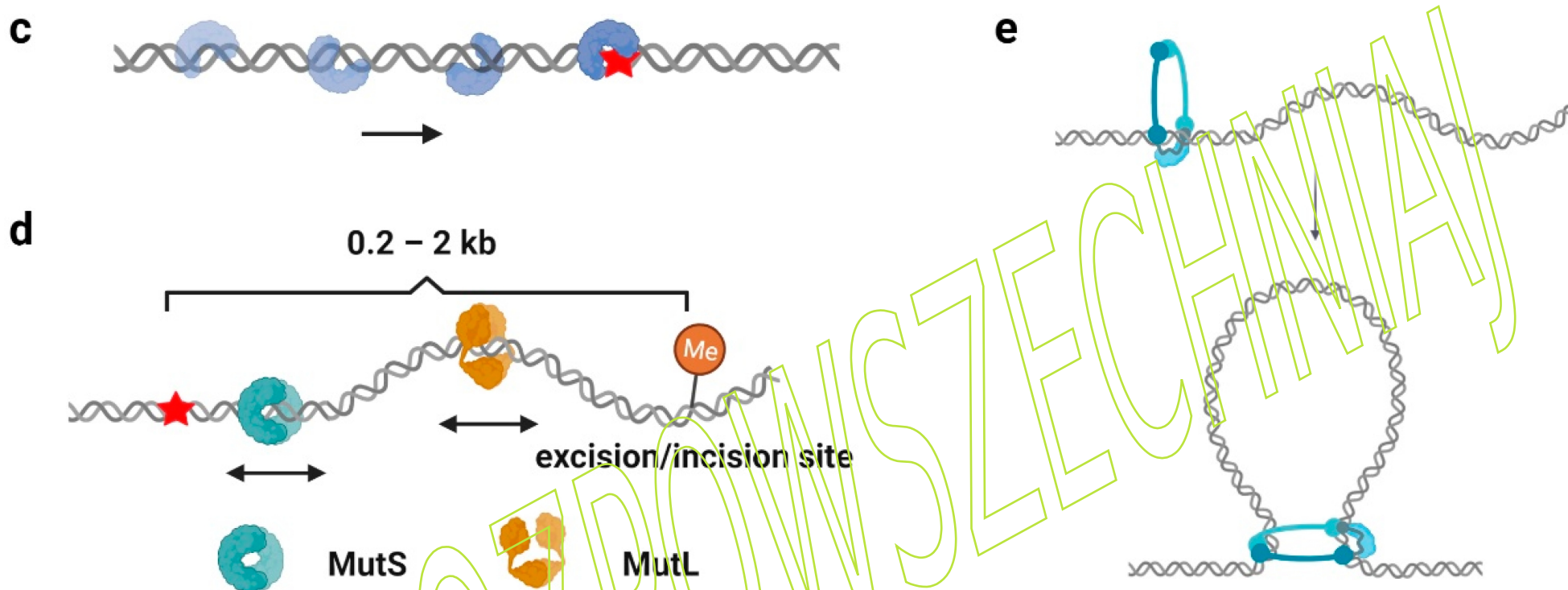


(5.) Ilustracja obrazowania różnych stanów interakcji DNA-białko w czasie za pomocą AFM (mikroskopu sił atomowych). Czarna skrzynka reprezentuje detektor monitorujący ugięcie dźwigni (belki, ang. cantilever) z ostrzem pomiarowym (ang. Tip).

Biologiczne znaczenie jednowymiarowej dyfuzji poprzez ślizganie się białka po DNA.



(a) Ilustracja przedstawiająca proces przemieszczania się endonukleazy celującej w miejsce o specyficznej sekwencji w genomie poprzez ułatwioną dyfuzję. Strzałki wskazują przesuwanie się endonukleazy do miejsca docelowego. (b) Ilustracja przedstawiająca rozwijanie i ponowne spinanie dwuniciowego DNA przez helikazę. Czarne strzałki wskazują kierunki translokacji helikazy.



(c) ilustracja przedstawiająca skanowanie przez białko naprawcze wzdłuż szkieletu DNA i rozpoznanie miejsca uszkodzenia (czerwona gwiazdka);
 (d) Ilustracja przedstawiająca “komunikację na odległość” między niedopasowaniem w podwójnej nici DNA (czerwona gwiazdka) a miejscem wycięcia/nacięcia za pośrednictwem przesuwających się białek MutS i MutL. Strzałki wskazują przesuwanie się MutS i MutL;
 (e) Ilustracja przedstawiająca wiązanie kondensyny z DNA i wytłaczanie jej w postaci pętli w celu przestrzennego uporządkowania chromosomów.

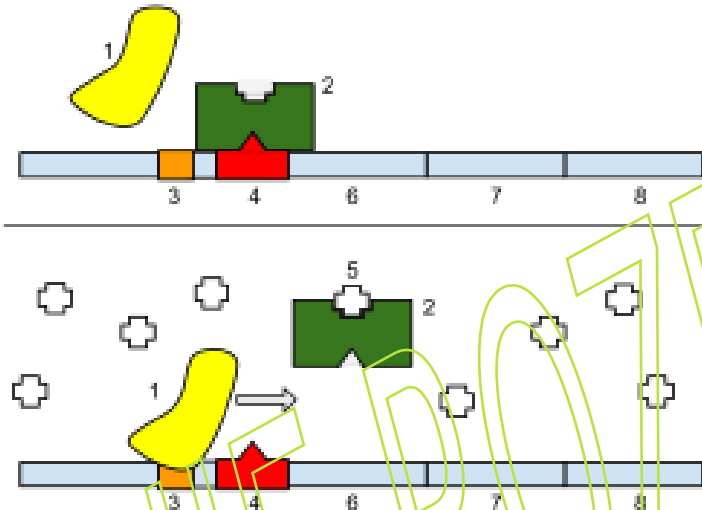
System naprawy błędów parowania zasad w DNA (mismatch repair, MMR) to system rozpoznawania i naprawy błędnego wstawienia, usunięcia i błędnego włączenia zasad, które mogą powstać podczas replikacji i rekombinacji DNA, a także naprawy niektórych form uszkodzeń DNA. MutS i MutL są przykładami białek MMR. Tworzą zależne od ATP zaciski pierścieniowe podczas MMR.

Petter Hammar, Prune Leroy, Anel Mahmutovic, Erik G. Marklund, Otto G. Berg, Johan Elf

The lac Repressor Displays Facilitated Diffusion in Living Cells

Science 336:1595-1598 (2012)

Opracowano eksperyment, który pozwala badać proces ślizgania się pojedynczej cząsteczki czynnika transkrypcyjnego* (TF, w tym wypadku to represor lacI) w żywych bakteriiach *E. coli*.



*Czynniki transkrypcyjne (TF) to białka regulujące ekspresję genów poprzez wiązanie się do specyficznych sekwencji na chromosomie. Aby szybko i dokładnie znaleźć te miejsca, TF łączą jednowymiarowe (1D) przesuwanie się po DNA z dyfuzją 3D w cytoplazmie. Ten mechanizm ułatwionej dyfuzji wykazano in vitro, ale nie wykazano eksperymentalnie, że jest wykorzystywany w żywych komórkach.

Operon laktozowy reguluje stężenie enzymów odpowiedzialnych za rozkład laktozy. 1: Polimeraza RNA, 2: Represor, 3: Promotor, 4: Operator, 5: Laktoza, 6: lacZ, 7: lacY, 8: lacA. Przy braku laktozy represor uniemożliwia przyłączenie się polimerazy RNA i rozpoczęcie transkrypcji.

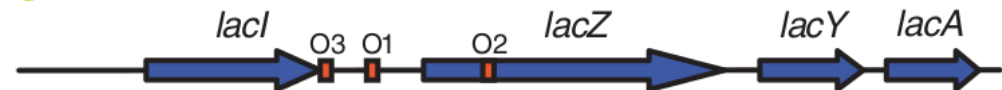
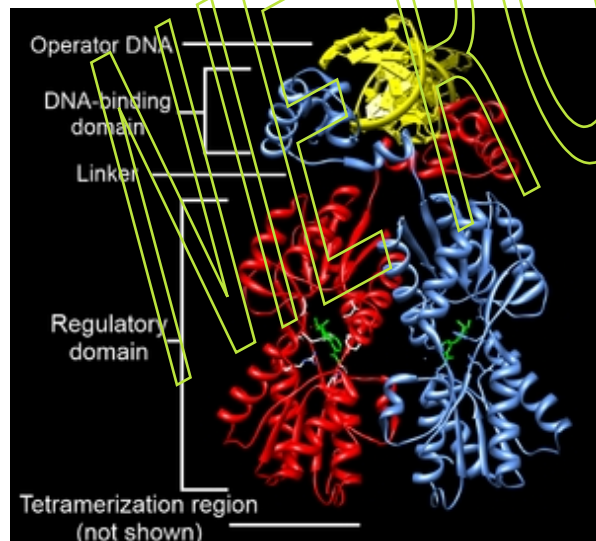
Można rozróżnić geny strukturalne kodujące enzymy i geny regulatorowe kodujące białka wpływające na ekspresję genów. Produktem genu lacZ jest β -galaktozydaza, która rozkłada laktozę, disacharyd, na glukozę i galaktozę. lacY koduje permeazę β -galaktozydową, białko błonowe, które osadza się w błonie cytoplazmatycznej, umożliwiając komórkowy transport laktozy do komórki. Wreszcie lacA koduje transacetylazę β -galaktozydową.

Operon lac E. coli.



Gen *lacI* (gen regulujący operon *lac*) wytwarza białko, które blokuje wiązanie RNAP z operonem operonu. Białko to można usunąć tylko wtedy, gdy alloiaktaza zwiąże się z nim i unieszkodliwi go. Białko utworzone przez gen *lacI* jest znane jako represor *lac*. Rodzaj regulacji, któremu podlega operon *lac*, określa się mianem indukowalnego ujemnego, co oznacza, że gen jest wyłączany przez czynnik regulacyjny (represor *lac*), chyba że dodana zostanie jakaś cząsteczka (laktoza). Po usunięciu represora RNAP przystępuje do transkrypcji wszystkich trzech genów (*lacZYA*) na mRNA. Represor *lac* jest zawsze wyrażany, chyba że wiąże się z nim koinduktor.

W genetyce promotor to sekwencja DNA, z którą wiążą się białka, aby zainicjować transkrypcję pojedynczego transkryptu RNA z DNA znajdującego się poniżej promotora. Transkrypt RNA może kodować białko (mRNA) lub może pełnić funkcję samą w sobie, taką jak tRNA lub rRNA.



Wt

Represor *lac* (LacI) jest dimerem dimerów. W warunkach represji jeden dimer wiąże się z głównym operatorem *lac*, O1, a drugi dimer wiąże się z jednym ze słabszych operatorów pomocniczych, O2 lub O3. Wiązanie LacI z O1 zapobiega transkrypcji operonu *lac* przez polimerazę RNA (*lacZYA*). Po związaniu alloiaktazy, pośredniego metabolitu szlaku laktozowego lub niedegradowalnego analogu, takiego jak IPTG (izopropyl- β -D-1-tiogalaktopiranozyd), powinowactwo represora do operatora ulega znacznemu zmniejszeniu do poziomu porównywalnego z powinowactwem do niespecyficznego miejsca wiązania na DNA.

Monomery (czerwony i niebieski) zawierają domeny wiążące i rdzeniowe DNA (żółty). Drugiego dimeru nie pokazano.

<https://www.khanacademy.org/science/ap-biology/gen...>

Johan Elf, Gene-Wei Li, X. Sunney Xie

Probing Transcription Factor Dynamics at the Single-Molecule Level in a Living Cell, *Science* 316:1191-1194 (2007)

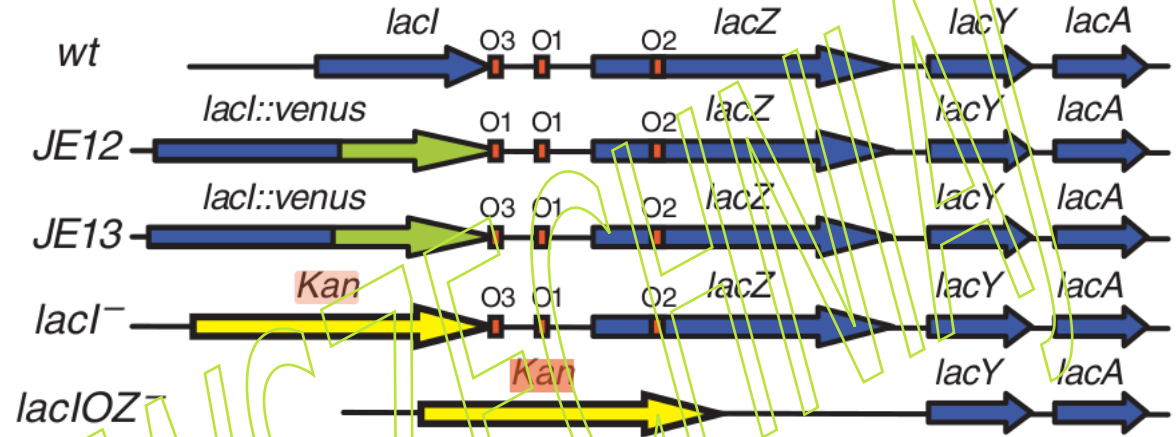
Region chromosomalny *lac* dzięki odmianie *E. coli* (BW25933) i różne jego modyfikacje wykorzystane w przedstawianej pracy. JE12 ma dwa miejsca silnego wiązania białka fuzyjnego.

JE13 jest taki jak wt, jest użyte aby wykazać, że białko fuzyjne ma aktywność regulacyjną, *lacI*⁻ to szczep z usuniętym rejonem *lacI*, *lacIOZ*⁻ to szczep z usuniętym całym rejonem *lacIOZ*.

Aby zobrazować represor *lac*, został on ekspresjonowany z natywnego chromosomalnego locus *lacI* jako fuzja C-końcowa z szybko dojrzewającym (~7 min) białkiem żółtej fluorescencji (YFP) Venus (A206K). Krótki czas dojrzewania zapobiega zajęciu miejsc operatora *lac* przez niedojrzałe białka fuzyjne. Fuzja C-końcowa pozwala uniknąć interferencji z N-końcową domeną wiążącą DNA. Otrzymane białko fuzyjne tworzy dimer, który podobnie jak większość innych fuzji C-końcowych z LacI nie ulega tetrameryzacji, co eliminuje możliwość zapętlenia DNA przez to białko. Znakowany dimer zwiększa ekspresję *lacZ* ~100-krotnie w odpowiedzi na pełną indukcję przez IPTG w 37°C.

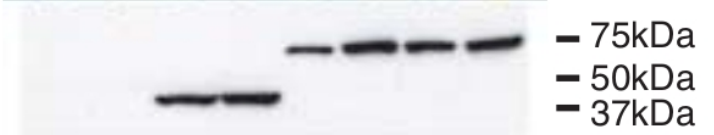
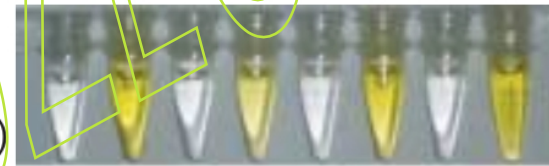
Delecje *lacI* lub całego regionu *lacIOZ* wykonano poprzez podstawienie wybranych regionów chromosomowych kasetą kanamycyny*. Nie ustalono czy jeden czy dwa dimery TF były związane z regionem operatora zawierającym dwa operatory O1.

*W biologii kasetka genowa jest rodzajem mobilnego elementu genetycznego, który zawiera gen i miejsce rekombinacji. Powinno być kanamycyn resistance cassette. Kanamycyna A, często nazywana po prostu kanamycyną, to antybiotyk stosowany w leczeniu ciężkich infekcji bakteryjnych i gruźlicy.



lacZ activity (Miller assay)

lacI expression (Western)

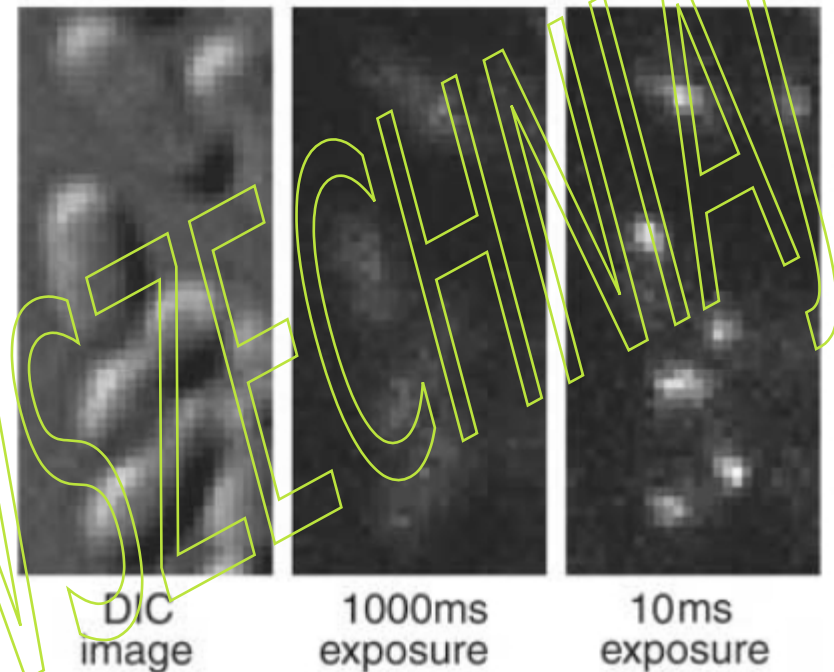
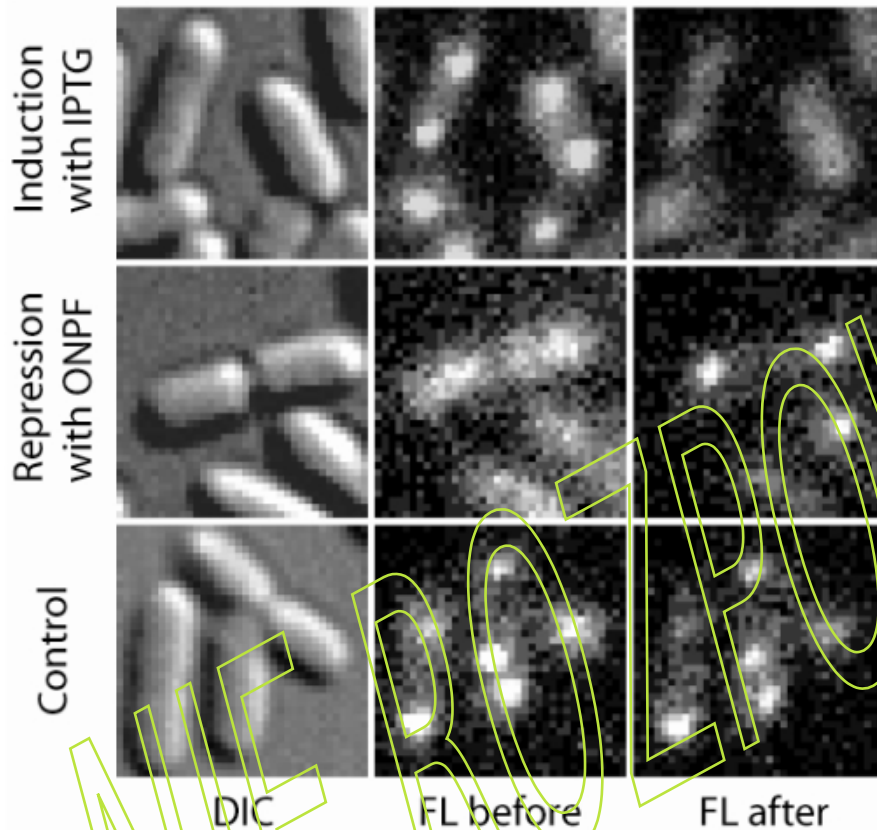


lacIOZ⁻
lacI⁻
wt(-IPTG)
wt(+IPTG)
JE12(-IPTG)
JE12(+IPTG)
JE13(-IPTG)
JE13(+IPTG)

Test aktywności Millera pokazuje, że szczepy fuzyjne YFP (JE12 i JE13) są aktywne i odpowiadają na indukcję przez IPTG (1 mM, 3 godziny) przez derepresję *lacZ* (żółty). Analiza Western dla LacI pokazuje, że JE12 i JE13 ekspresjonują pełnej długości białko fuzyjne (67 kD) i że ekspresja w JE12 przy braku IPTG jest silnie autorepresjonowana w porównaniu z typem dzikim i JE13.

rozdzielenie między zlokalizowanymi i rozproszonymi sygnałami fluorescencji

Science 316:1191-1194 (2007)



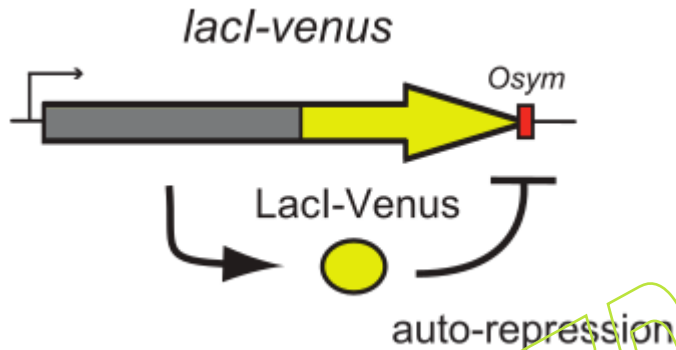
Górny rząd pokazuje te same bakterie JE12 przed i 40 sekund po dodaniu IPTG do końcowego stężenia 1 mM. W tym przedziale czasu TF oddzielają się od operatorów w prawie wszystkich komórkach. Środkowy rząd pokazuje te same bakterie JE12 przed i 1 minutę po rozcieńczeniu IPTG od 100 μ M do 2 μ M. Dolny rząd pokazuje dwie ekspozycje tej samej bakterii JE12 bez dodawania lub usuwania induktora.

Aby określić niespecyficzny czas przebywania na DNA LacI-Venus związanego z IPTG w żywej komórce, rejestruje się obrazy fluorescencyjne przy różnych czasach ekspozycji. Obrazowanie nieswoiście związanego LacI. Pokazane są dwa obrazy fluorescencyjne z różnymi czasami ekspozycji i odpowiadający im obraz DIC komórek E. coli indukowanych IPTG. Przy 1000 ms poszczególne LacI-Venus pojawiają się jako rozproszone tło fluorescencji. Przy 10 ms są one wyraźnie widoczne jako plamki prawie ograniczone dyfrakcyjnie.

Petter Hammar, Prune Leroy, Anel Mahmutovic,
Erik G. Marklund, Otto G. Berg, Johan Elf

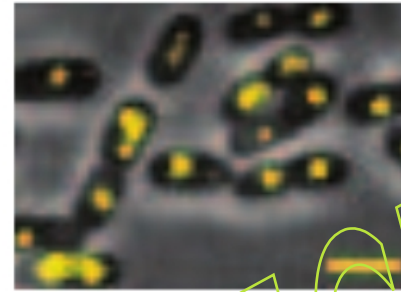
The lac Repressor Displays Facilitated Diffusion in Living Cells

Science 336:1595-1598 (2012)

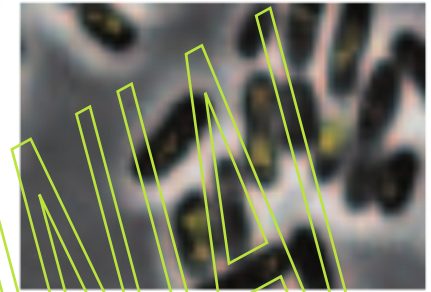
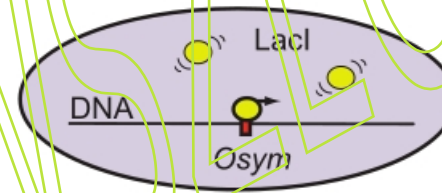


Warunkiem koniecznym do wykrycia poprzez wzmocnienie lokalizacji jest to, że liczba kopii TF musi być niska. LacI, podobnie jak większość innych TF w *E. coli*, ulega naturalnej ekspresji na niskim poziomie – około 20 monomerów na gen *lacI*. Wynika to z autorepresji operatora O3, który pokrywa się z częścią genu *lacI*. Jeszcze bardziej obniżono poziom ekspresji, zastępując operator O3 sekwencją operatora O1, zwiększając w ten sposób autorepresję. Zmniejsza to poziom ekspresji ~3-krotnie w porównaniu z typem dzikim. W tej pracy (Science 2012) autorepresja jest zwiększana poprzez pojedyncze sztuczne miejsce operatora *lacOsym* częściowo nakładające się na region kodujący represor.

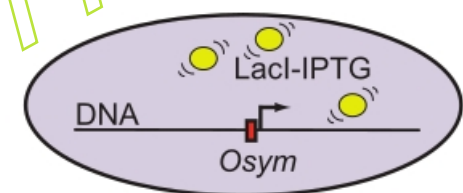
Operator *lacOsym* to zmodyfikowane, symetryczne miejsce wiązania na DNA zbudowane z miejsca bliższej połówki *lacO1*.



Repressed (-IPTG)



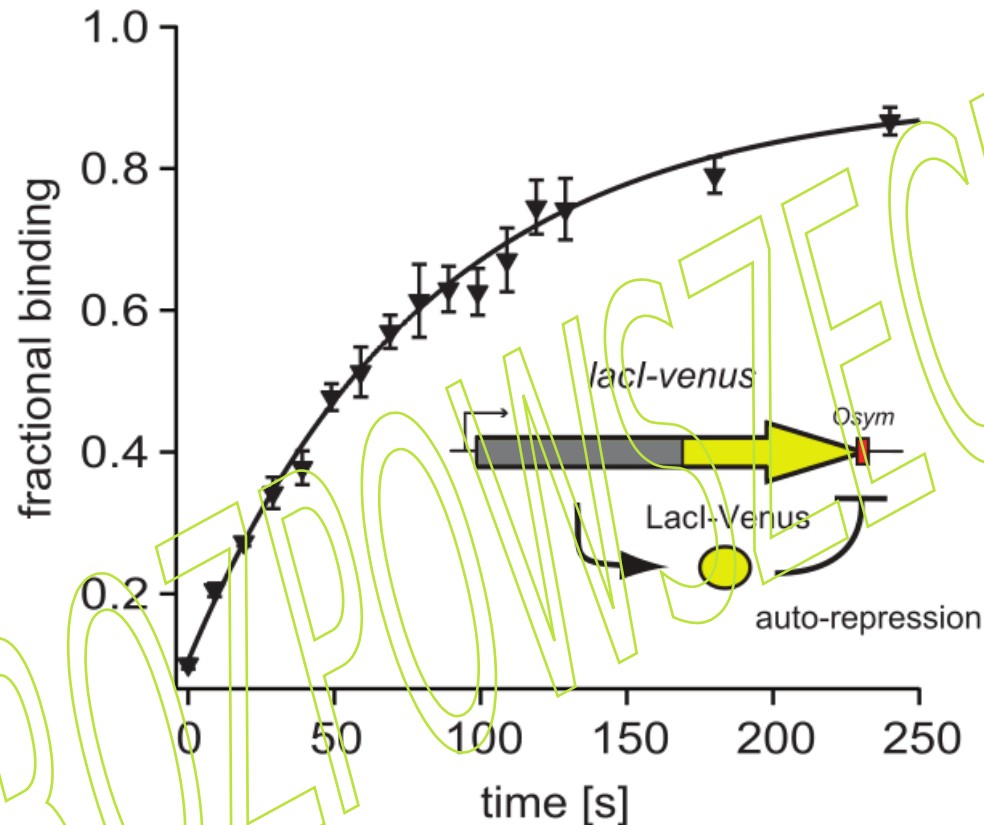
Induced (+IPTG)



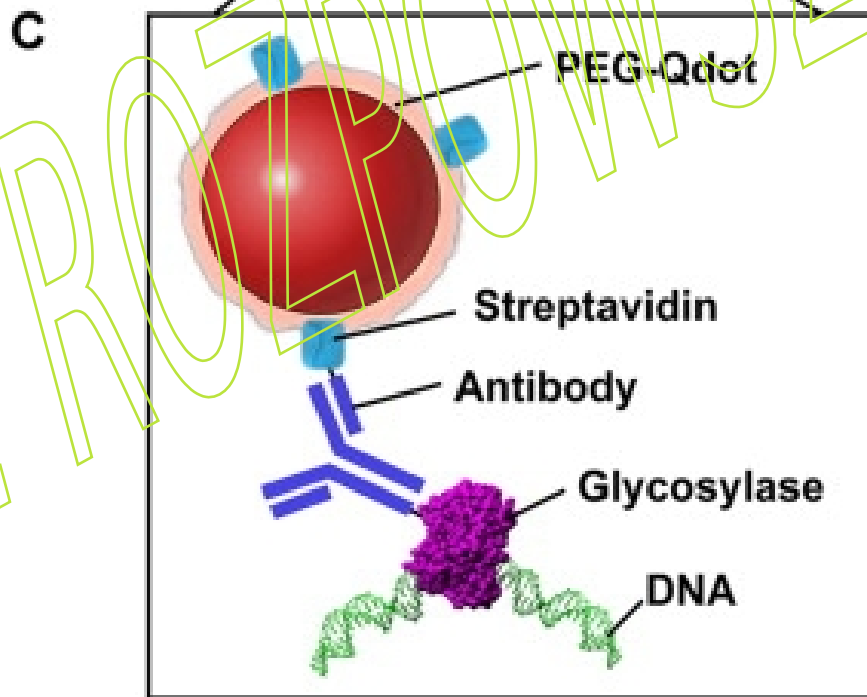
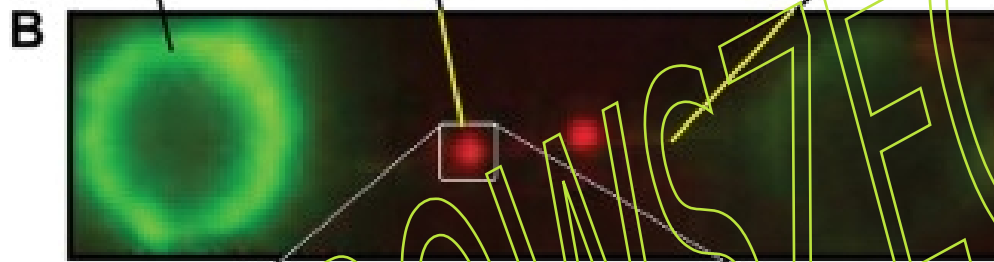
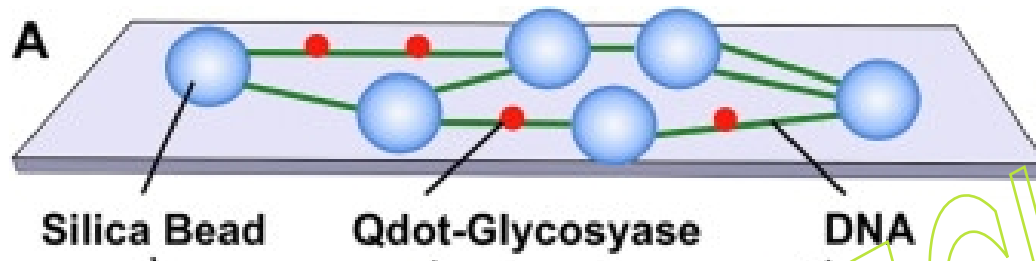
Nałożone obrazy komórek *E. coli* otrzymane za pomocą kontrastu fazowego i mikroskopii fluorescencyjnej. Po lewej stan represji (-IPTG): LacI-Venus wiąże się z pojedynczym operatorem chromosomalnym (*lacOsym*) i pojawia się jako plamka ograniczona dyfrakcyjnie (żółta). Po prawej komórki indukowane przez IPTG (300 mM), co zapobiega specyficznemu wiązaniu operatora i skutkuje rozproszonym sygnałem fluorescencji z szybko dyfundujących cząsteczek LacI-Venus. Pasek skali: 2 μm .

W 4-sekundowej skali czasu poszczególne cząsteczki LacI-Venus związane z operatorem pojawiają się jako plamy ograniczone dyfrakcją na tle swobodnie dyfundujących cząsteczek. Mierzac średnią liczbę plamek fluorescencyjnych na komórkę w funkcji czasu po usunięciu induktora, izopropylu- β -D-1-tiogalaktopiranozydu (IPTG), można monitorować kinetykę wiązania TF z pojedynczym miejscem operatora w chromosomie *E. coli* z rozdzielczością czasową rzędu sekund.

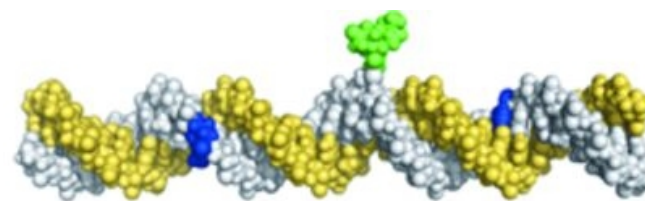
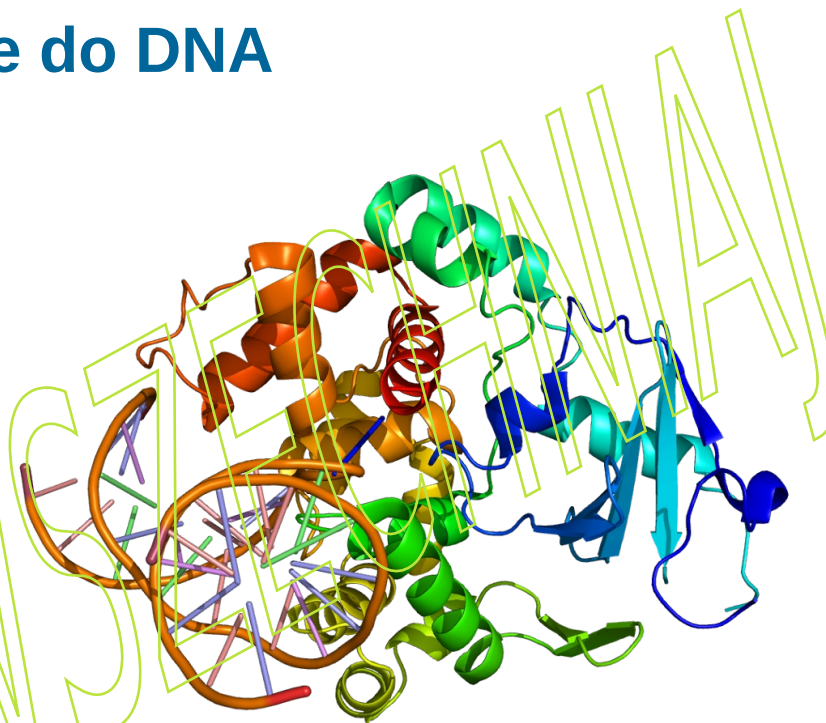
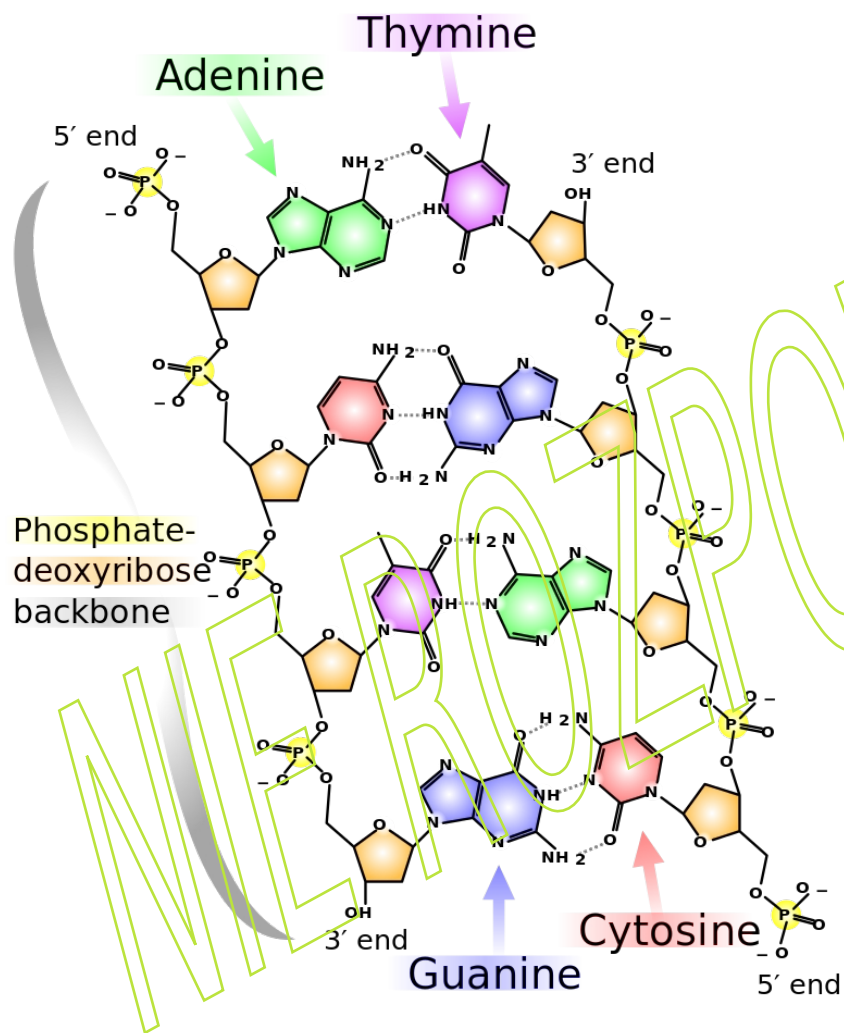
Single-operator binding assay



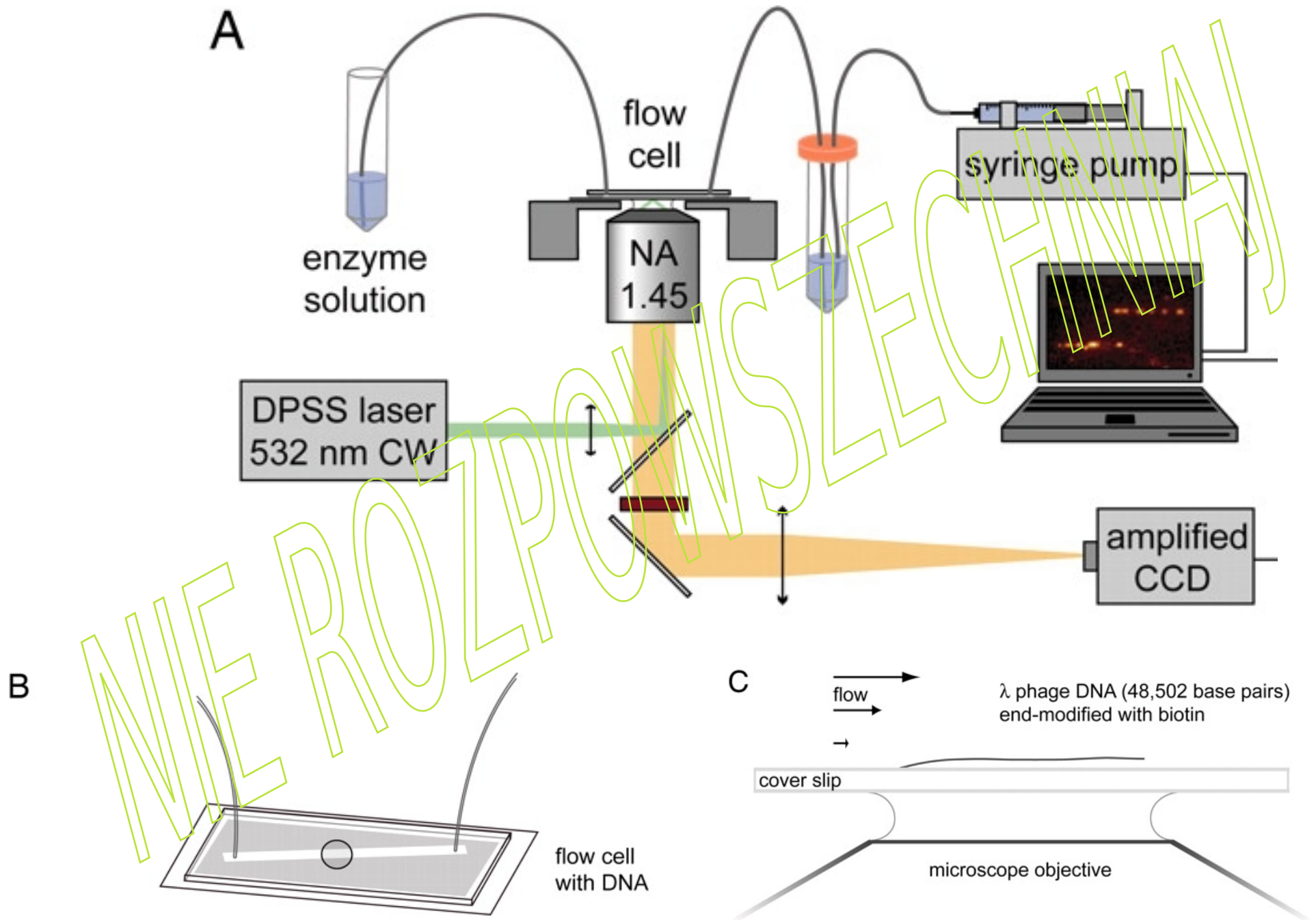
Szybkość asocjacji z pojedynczym operatorem chromosomalnym określa się poprzez pomiar średniej liczby plamek fluorescencyjnych na komórkę w funkcji czasu po usunięciu induktora IPTG. Wiązanie ułamkowe, tj. średnia liczba jasnych plam ograniczonych dyfrakcją na komórkę w funkcji czasu, jest dopasowane do pojedynczej funkcji wykładniczej $a(1 - be^{-kt})$. (Wstawka: Dokładność testu zależy od utrzymania niskiej i równomiernej ekspresji LacI-Venus. Osiąga się to poprzez zastosowanie silnej autorepresji, w której pośredniczy idealny operator lac lacOsym lub lacO1 w pozycji, która zachodzi na koniec 3' sekwencji kodującej lacI-venus). Kiedy zmierzono szybkość asocjacji w szczepie z pojedynczym lacOsym (JE101), odkryto, że dla dowolnego z trzech do pięciu w pełni aktywnych dimerów LacI-Wenus, średni czas oczekiwania na asocjację z operatorem, wynosił 56 ± 2 s (błąd standardowy średniej, SEM). Oznacza to, że czas potrzebny pojedynczej cząsteczce represora na związanie z lacOsym wynosi 3 do 5 minut



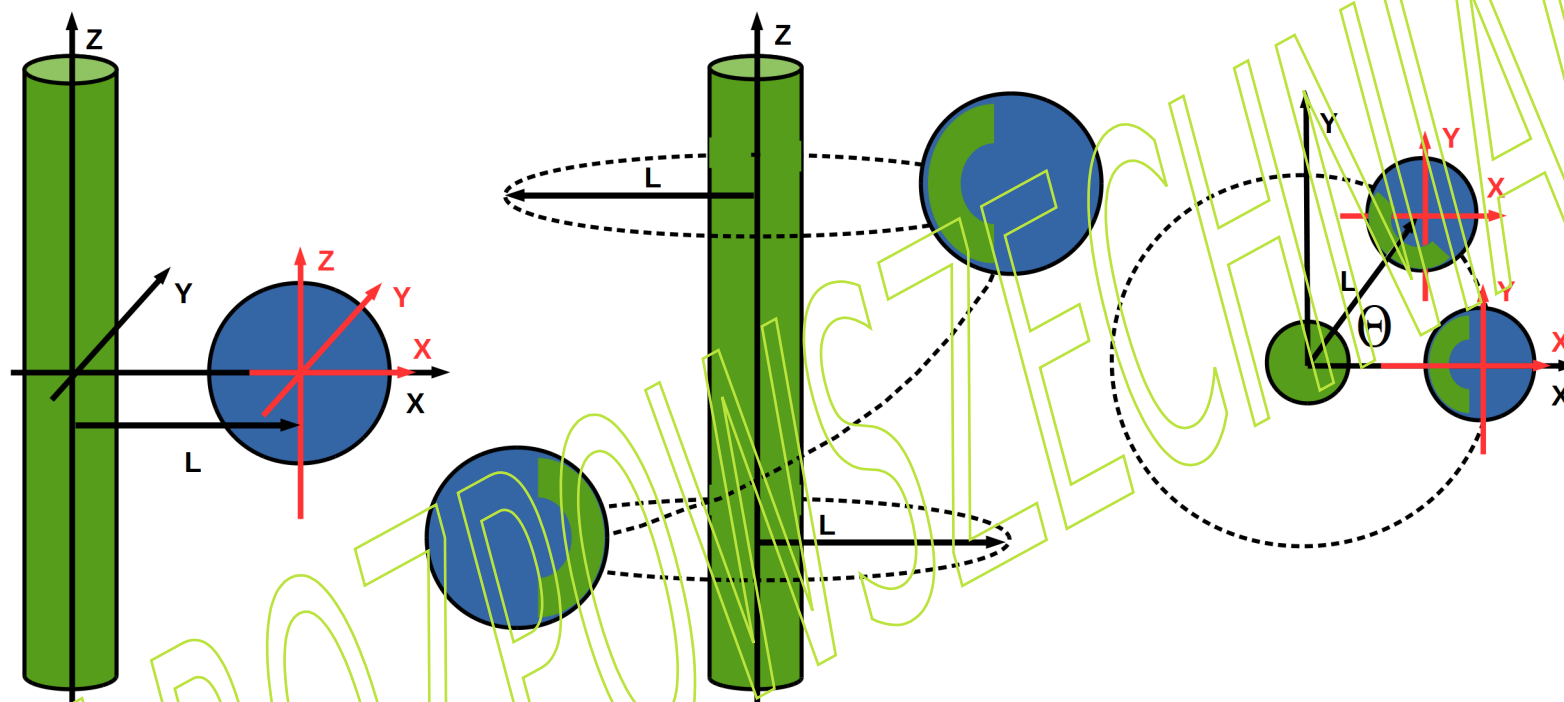
Białka wiążące się specyficznynie do DNA



Glikozydaza DNA 8-oxo-guaninowa

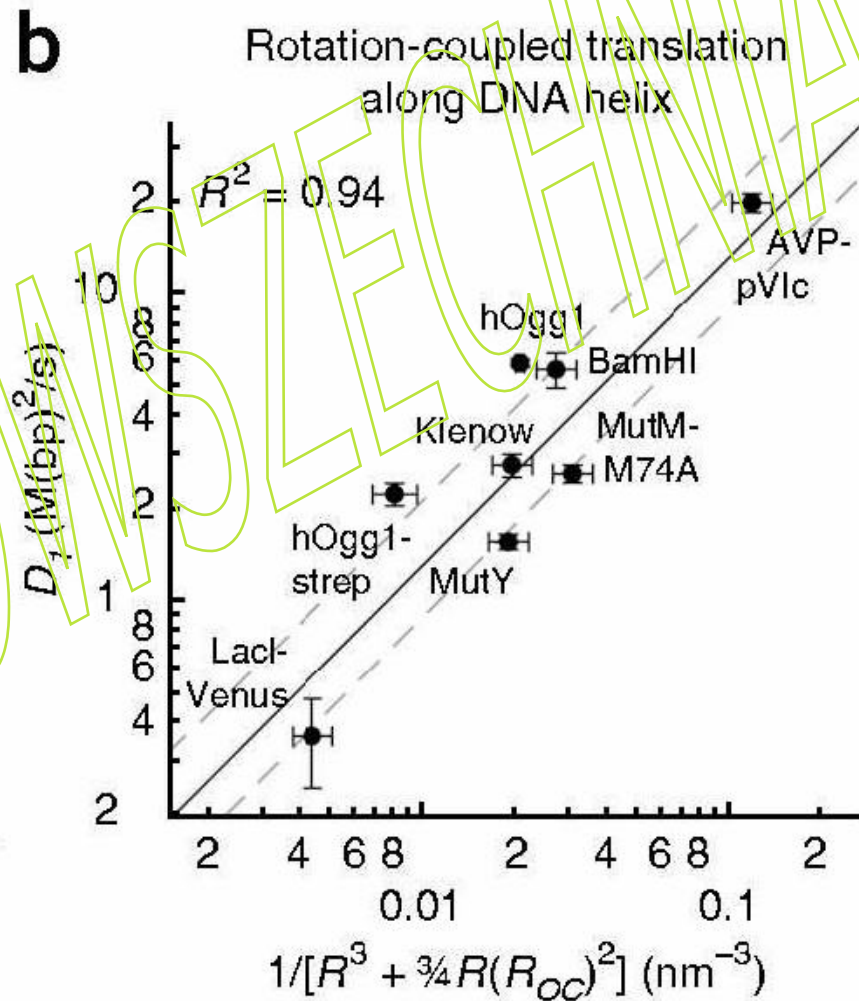
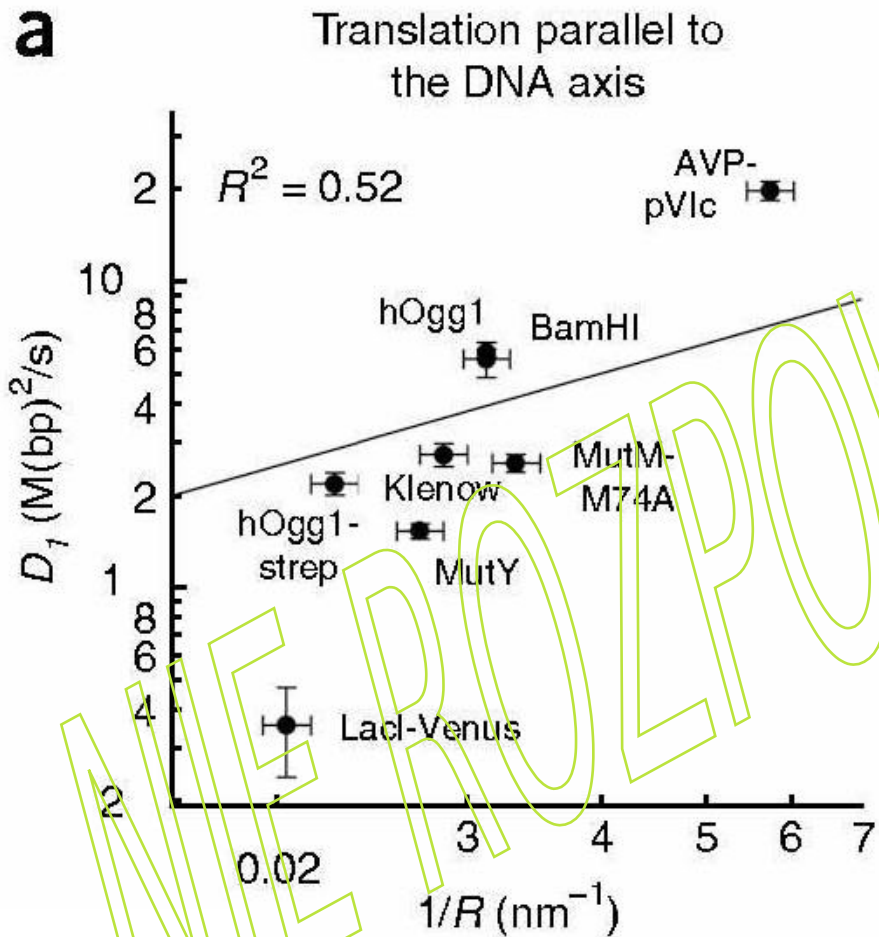


Przemieszczanie się białek po DNA

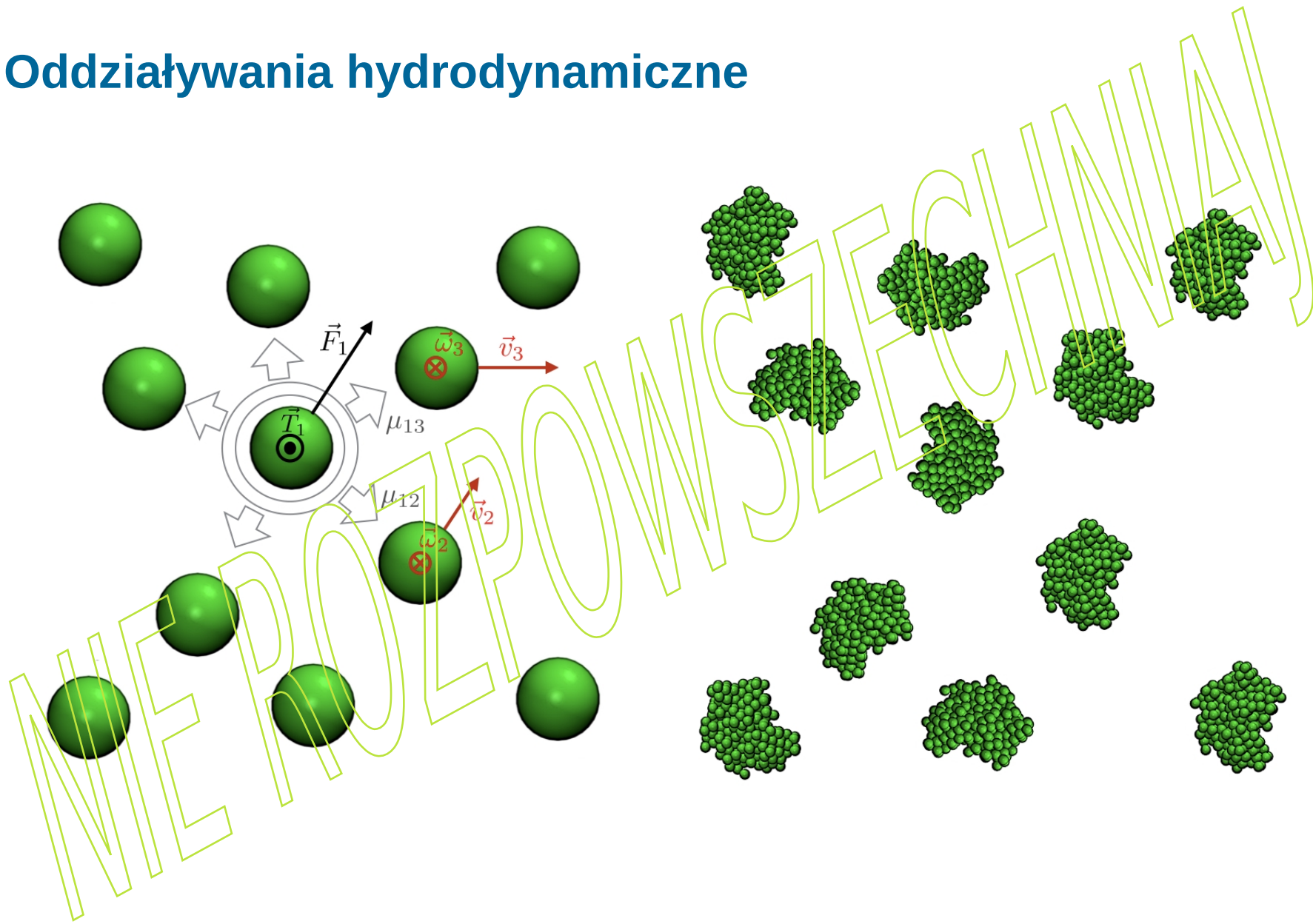


$$D = \frac{kT}{6\pi\eta\sigma + \left(\frac{2\pi}{10\Delta H}\right)^2 \cdot (8\pi\eta\sigma^3 + 6\pi\eta\sigma L^2)}$$

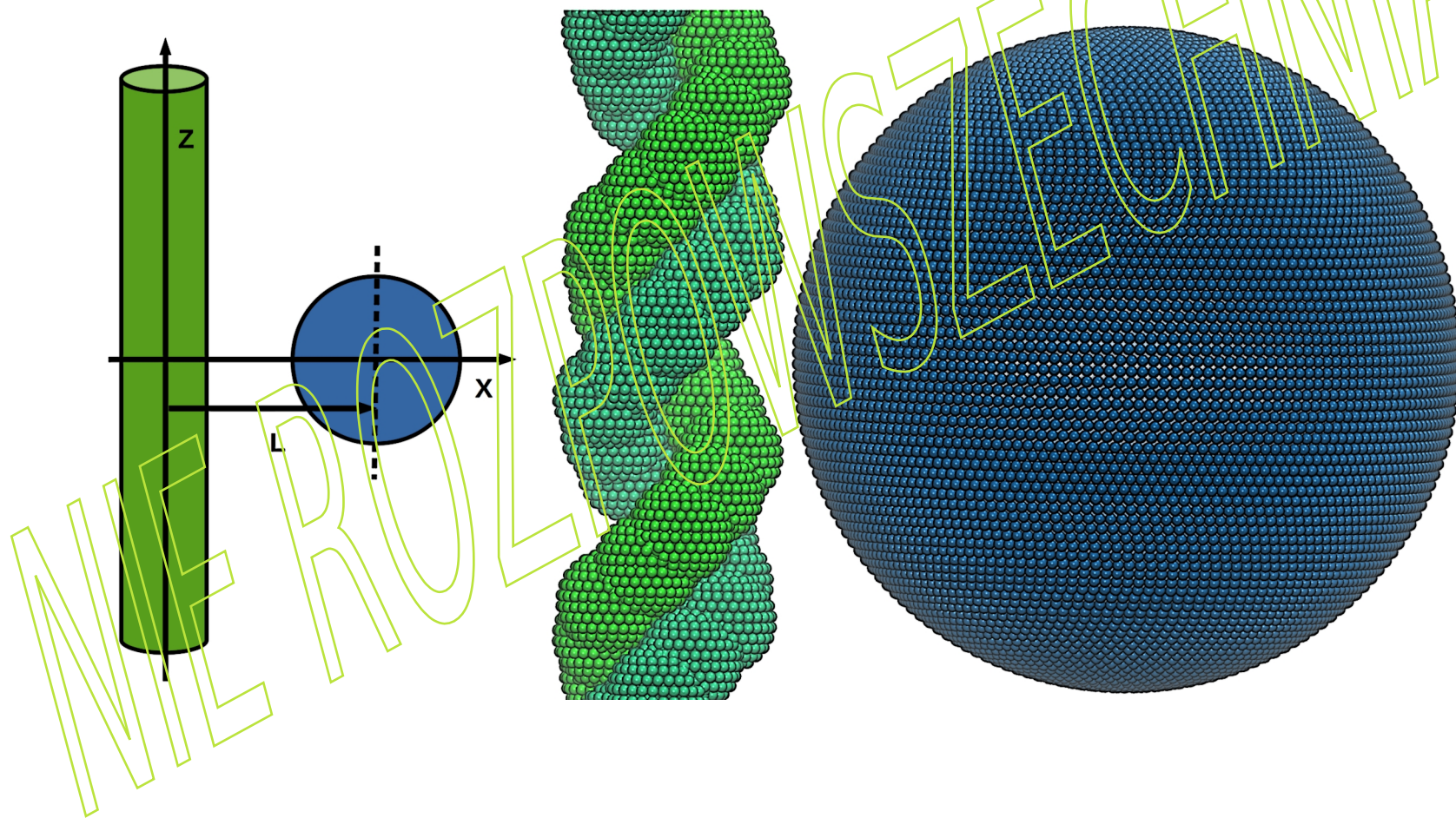
$$D_t = \frac{kT}{6\pi\eta\sigma} \quad D_r = \frac{kT}{8\pi\eta\sigma^3}$$



Oddziaływania hydrodynamiczne



Model do obliczenia wpływu oddziaływań hydrodynamicznych na dyfuzję białka wzdłuż DNA



Stosunki współczynników dyfuzji białek w ich spiralnym ruchu wzdłuż DNA obliczonych bez uwzględnienia oddziaływań hydrodynamicznych białko-DNA do tych obliczonych z uwzględnieniem oddziaływań hydrodynamicznych w funkcji promienia białka.

Promień σ [Å]	Odległość L [Å]	$D_{no\ HI}/D_{HI}$
15.	27.	4.07
20.	32.	3.95
25.	37.	3.89
30.	42.	3.88