

Wybrane Zagadnienia Biofizyki Molekularnej

(1100-5BM15)

Jan M. Antosiewicz

Zakład Biofizyki
Instytut Fizyki Doświadczalnej
Wydział Fizyki

WKŁAD 13

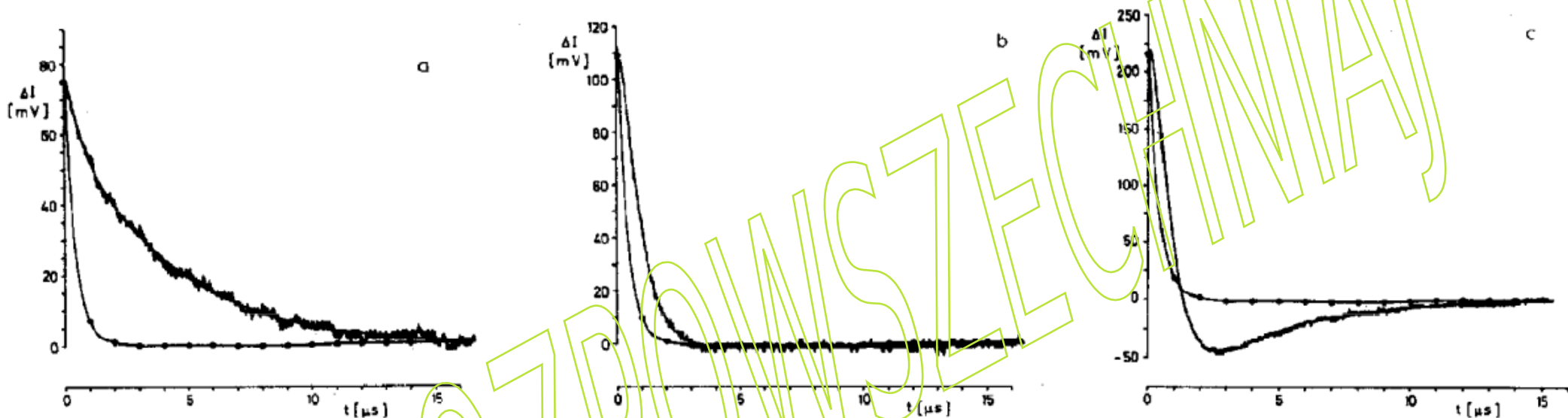
20 listopada, 2024

**Kinetyka biomolekularna
(metody relaksacyjne, E-jump - część 3)**

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

jantosi@fuw.edu.pl

W niniejszej pracy opisujemy dość nietypowy sygnał elektrooptyczny, który zaobserwowano w sposób powtarzalny dla pewnych fragmentów DNA w dobrze określonych warunkach eksperymentalnych.



Krzywe zaniku dichroizmu (zmiana natężenia światła ΔI przy 248 nm w czasie t po zakończeniu impulsu) obserwowane dla fragmentu o 179 bp w buforze B10 (B1=1 mM NaCl, 1 mM kakodylan sodu, pH 7, 0,2 mM EDTA, B10=B1 +10 mM NaCl) w temperaturze 2°C po impulsach pola elektrycznego (a) 15 kV/cm dla 9 μ s, (b) 28 kV/cm dla 14 μ s i (c) 40 kV/cm dla 14 μ s.

Linie bez szumu reprezentują dopasowanie metodą najmniejszych kwadratów przy użyciu krzywych odniesienia oznaczonych kółkami w celu dekonwolucji.

Stałe czasowe τ i amplitudy A wynoszą: (a) $\tau_1 = 0,22 \mu$ s, $A_1 = 17$ mV; $\tau_2 = 4,3 \mu$ s, $A_2 = 57$ mV; (b) $\tau = 0,57 \mu$ s, $A = 109$ mV; (c) $\tau_1 = 0,60 \mu$ s, $A_1 = 343$ mV, $\tau_2 = 2,95 \mu$ s, $A_2 = -120$ mV.

Pokazujemy, że ten niezwykły sygnał nie może być przypisany żadnej ze znanych reakcji indukowanych polem, ale jest on zgodny z obliczeniami dla modelu hydrodynamicznego i elektrycznego zakładającego zakrzywienie podwójnej helisy DNA.

Coupling between the translational and rotational brownian motions of rigid particles of arbitrary shape: II. General theory

Howard Brenner

Journal of Colloid and Interface Science, 23:407-436 (1967)



Opracowano ogólne zależności fenomenologiczne opisujące dyfuzyjny i konwekcyjny transport małych, sztywnych, anizotropowych cząstek o dowolnym kształcie w przestrzeni orientacji fizycznej. Stosując makroskopowy model hydrodynamiczny, macierz dyfuzji 6×6 wynikająca z teorii jest powiązana z quasi-statyczną macierzą oporu hydrodynamicznego cząstki, zapewniając w ten sposób ostateczne uogólnienie równań Stokesa-Einsteina. Systematycznie bada się ogólne właściwości macierzy dyfuzji, szczególnie pod względem jej dodatniości, symetrii i zależności od wyboru położenia układu współrzędnych, w którym jest opisana cząstka. Wskazano koncepcyjne i obliczeniowe zalety podziału tej macierzy na 4 bloki 3×3 . Wykazano, że istnienie **sprzężenia między translacyjnymi i rotacyjnymi ruchami Browna** zmienia się w zależności od wartości podmacierzy „dyfuzyjności sprzężenia” w „środku dyfuzji” cząstki. W przypadku cząstek pozbawionych śrubowej asymetrii geometrycznej sprzężenie nie występuje.

Oddziaływania hydrodynamiczne

Dla jednej kulistej cząstki o promieniu σ poruszającej się z prędkością \mathbf{v} w nieograniczonym ośrodku o lepkości η

$$\vec{F} = -6\pi\eta\sigma\vec{v}$$

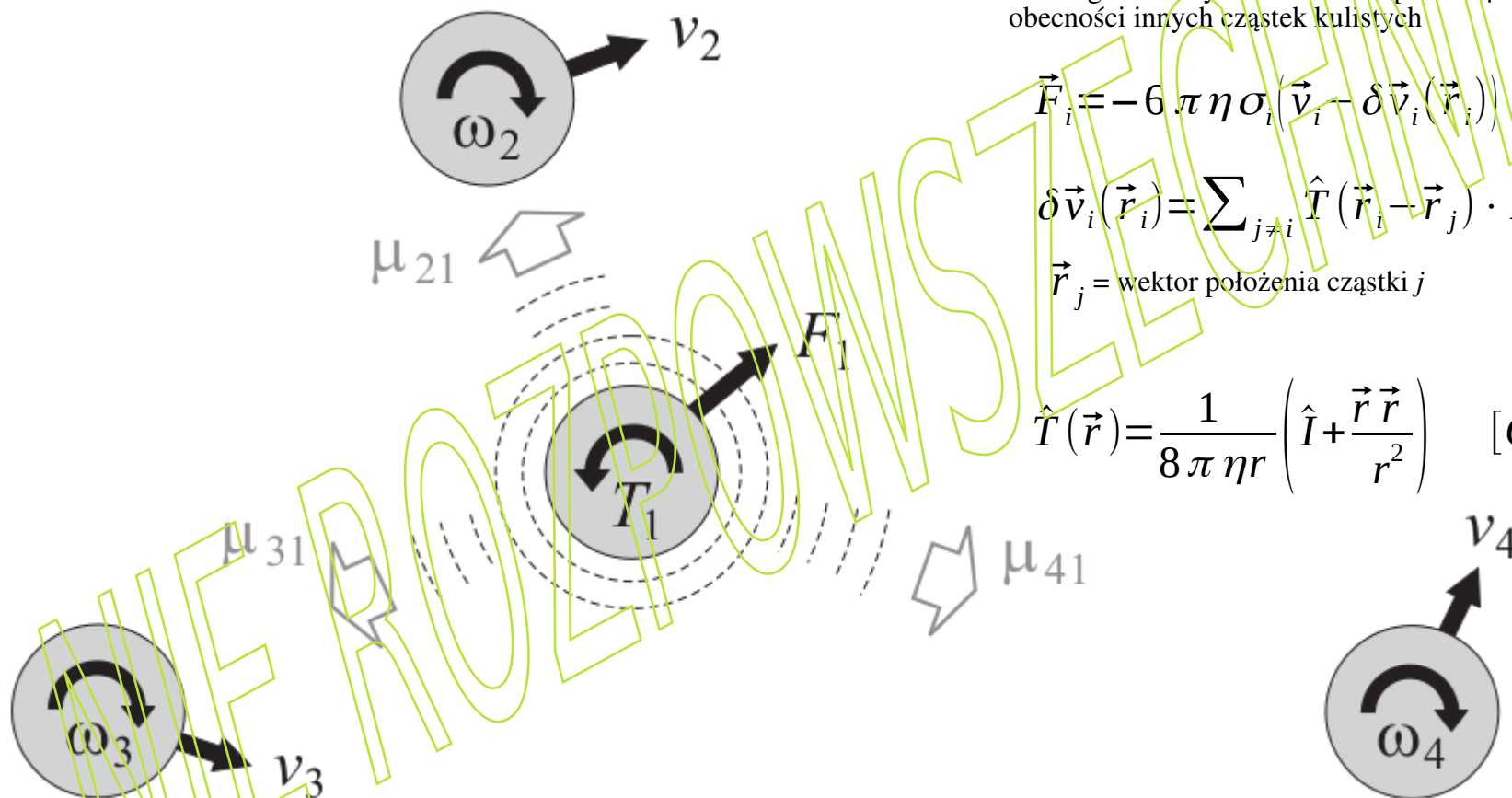
Dla i -tej cząstki sferycznej o promieniu σ_i poruszającej się w nieograniczonym ośrodku o lepkości η z prędkością \mathbf{v}_i w obecności innych cząstek kulistych

$$\vec{F}_i = -6\pi\eta\sigma_i(\vec{v}_i - \delta\vec{v}_i(\vec{r}_i))$$

$$\delta\vec{v}_i(\vec{r}_i) = \sum_{j \neq i} \hat{T}(\vec{r}_i - \vec{r}_j) \cdot \vec{F}_j(\vec{r}_j)$$

\vec{r}_j = wektor położenia cząstki j

$$\hat{T}(\vec{r}) = \frac{1}{8\pi\eta r} \left(\hat{I} + \frac{\vec{r}\vec{r}}{r^2} \right) \quad [\text{Oseen, 1929}]$$



Cząsteczki poruszające się w lepkim płynie tworzą wokół siebie pole przepływu, poprzez które ich ruchy są wzajemnie sprzężone. Dlatego te tak zwane oddziaływania hydrodynamiczne stanowią złożony problem obejmujący wiele ciał. Zaburzenia płynu spowodowane translacjami i obrotami zawieszonych cząstek mają duży zasięg, podobnie jak powstałe interakcje między cząstkami (Michael Reichert, *Hydrodynamic Interactions in Colloidal and Biological Systems*, Dissertation, Universität Konstanz, 2006).

$$\hat{T}(\vec{r}) = \frac{1}{8\pi\eta r} \left(\hat{I} + \frac{\vec{r}\vec{r}}{r^2} \right)$$

$$\vec{r} = \begin{pmatrix} x \\ y \\ z \end{pmatrix}; \quad r^2 = x^2 + y^2 + z^2$$

$$\vec{r} \cdot \vec{r} = (x \quad y \quad z) \begin{pmatrix} x \\ y \\ z \end{pmatrix} = x \cdot x + y \cdot y + z \cdot z$$

iloczyn skalarny

$$\vec{r}\vec{r} = \begin{pmatrix} x \\ y \\ z \end{pmatrix} (x \quad y \quad z) = \begin{pmatrix} xx & xy & xz \\ yx & yy & yz \\ zx & zy & zz \end{pmatrix}$$

iloczyn bezpośredni

$$\hat{I} = \begin{pmatrix} 1 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix}; \quad \frac{\vec{r}\vec{r}}{r^2} = \frac{1}{r^2} \begin{pmatrix} x \\ y \\ z \end{pmatrix} (x \quad y \quad z) = \frac{1}{r^2} \begin{pmatrix} xx & xy & xz \\ yx & yy & yz \\ zx & zy & zz \end{pmatrix}$$

$$\begin{pmatrix} \alpha_{xx} & \alpha_{xy} & \alpha_{xz} \\ \alpha_{yx} & \alpha_{yy} & \alpha_{yz} \\ \alpha_{zx} & \alpha_{zy} & \alpha_{zz} \end{pmatrix} \cdot \begin{pmatrix} \beta_{xx} & \beta_{xy} & \beta_{xz} \\ \beta_{yx} & \beta_{yy} & \beta_{yz} \\ \beta_{zx} & \beta_{zy} & \beta_{zz} \end{pmatrix} =$$

$$\begin{pmatrix} \alpha_{xx}\beta_{xx} + \alpha_{xy}\beta_{yx} + \alpha_{xz}\beta_{zx} & \alpha_{xx}\beta_{xy} + \alpha_{xy}\beta_{yy} + \alpha_{xz}\beta_{zy} & \alpha_{xx}\beta_{xz} + \alpha_{xy}\beta_{yz} + \alpha_{xz}\beta_{zz} \\ \alpha_{yx}\beta_{xx} + \alpha_{yy}\beta_{yx} + \alpha_{yz}\beta_{zx} & \alpha_{yx}\beta_{xy} + \alpha_{yy}\beta_{yy} + \alpha_{yz}\beta_{zy} & \alpha_{yx}\beta_{xz} + \alpha_{yy}\beta_{yz} + \alpha_{yz}\beta_{zz} \\ \alpha_{zx}\beta_{xx} + \alpha_{zy}\beta_{yx} + \alpha_{zz}\beta_{zx} & \alpha_{zx}\beta_{xy} + \alpha_{zy}\beta_{yy} + \alpha_{zz}\beta_{zy} & \alpha_{zx}\beta_{xz} + \alpha_{zy}\beta_{yz} + \alpha_{zz}\beta_{zz} \end{pmatrix}$$

jedna cząstka sferyczna:

$$\vec{f} = -6 \pi \eta \sigma (\vec{v} - \vec{u}_0) \equiv -6 \pi \eta \sigma \vec{v} \equiv -\xi \vec{v}; \quad D_t = \frac{kT}{\xi}$$

molekuła modelowana jako układ wielu cząstek sferycznych (koralików):

$$\vec{f}_i = -6 \pi \eta \sigma_i (\vec{v}_i - \vec{u}(\vec{r}_i)) = -6 \pi \eta \sigma_i \left(\vec{v}_i + \sum_{j \neq i} \hat{T}(\vec{r}_j - \vec{r}_i) \vec{f}_j \right)$$

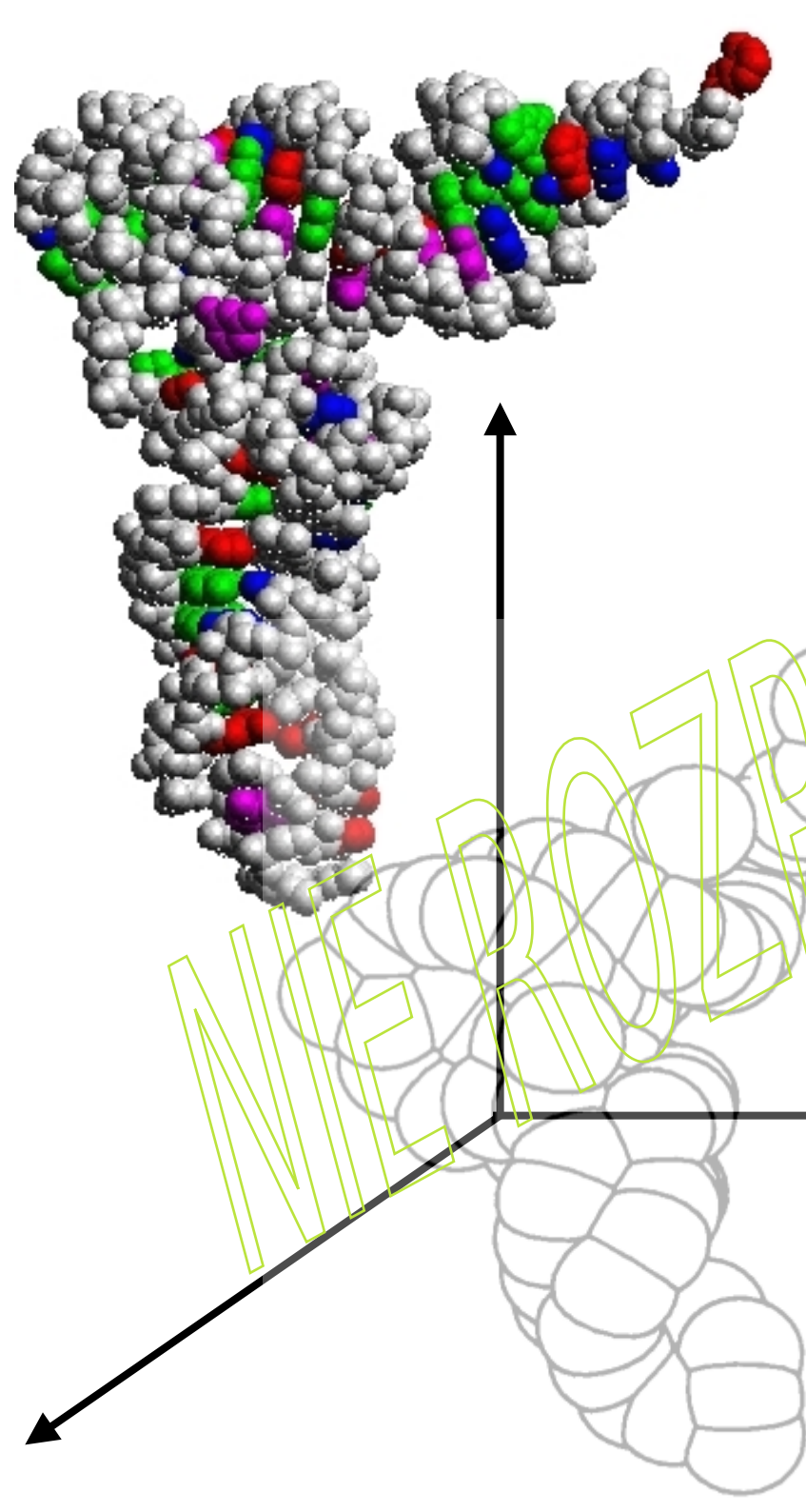
$$\sum_j \left[(1 - \delta_{ij}) \hat{T}_{ij} + \frac{1}{6 \pi \eta \sigma_i} \delta_{ij} \hat{I} \right] \vec{f}_j = -\vec{v}_i; \quad i, j = 1, 2, \dots, n$$

$$\begin{pmatrix} \hat{I}_{11} & \dots & \hat{I}_{1n} \\ \vdots & \dots & \vdots \\ \hat{I}_{n1} & \dots & \hat{I}_{nn} \end{pmatrix} \cdot \begin{pmatrix} \vec{f}_1 \\ \vdots \\ \vec{f}_n \end{pmatrix} = - \begin{pmatrix} \vec{v}_1 \\ \vdots \\ \vec{v}_n \end{pmatrix} \Rightarrow \begin{pmatrix} \vec{f}_1 \\ \vdots \\ \vec{f}_n \end{pmatrix} = - \begin{pmatrix} \hat{Q}_{11} & \dots & \hat{Q}_{1n} \\ \vdots & \dots & \vdots \\ \hat{Q}_{n1} & \dots & \hat{Q}_{nn} \end{pmatrix} \cdot \begin{pmatrix} \vec{v}_1 \\ \vdots \\ \vec{v}_n \end{pmatrix}$$

W algebrze liniowej macierz kwadratową A o wymiarach n na n nazywa się odwracalną (również nieosobliwą lub niezdegenerowaną), jeśli istnieje macierz B kwadratowa n na n taka, że:

$$\hat{A} \hat{B} = \hat{B} \hat{A} = \hat{I}$$

mamy tu do czynienia z macierzami kwadratowymi o wymiarach $3n$ na $3n$.



$$\begin{pmatrix} \vec{f}_1 \\ \vdots \\ \vec{f}_n \end{pmatrix} = - \begin{pmatrix} \hat{Q}_{11} & \cdots & \hat{Q}_{n1} \\ \vdots & \cdots & \vdots \\ \hat{Q}_{1n} & \cdots & \hat{Q}_{nn} \end{pmatrix} \cdot \begin{pmatrix} \vec{v}_1 \\ \vdots \\ \vec{v}_n \end{pmatrix}$$

A $\vec{v}_i = \begin{pmatrix} 1 \\ 0 \\ 0 \end{pmatrix}$

$$\vec{F} \stackrel{\text{def}}{=} \sum_{i=1}^n \vec{f}_i =$$

całkowita siła oporu, gdy cząstka jako całość porusza się w kierunku x z prędkością jednostkową; analogicznie możemy zapisać ruch w kierunku osi y i osi z.

B $\vec{\omega} = \begin{pmatrix} 1 \\ 0 \\ 0 \end{pmatrix} \Rightarrow \vec{v}_i = \vec{\omega} \times \vec{r}_i = \begin{pmatrix} z_i \omega_y - y_i \omega_z \\ x_i \omega_z - z_i \omega_x \\ y_i \omega_x - x_i \omega_y \end{pmatrix}$

$$\vec{T}_O \stackrel{\text{def}}{=} \sum_{i=1}^n \vec{r}_i \times \vec{f}_i = \sum_{i=1}^n \begin{pmatrix} y_i f_{zi} - z_i f_{yi} \\ y_i f_{zi} - z_i f_{yi} \\ y_i f_{zi} - z_i f_{yi} \end{pmatrix} =$$

całkowy moment oporu, gdy cząstka jako całość obraca się wzdłuż kierunku x z prędkością jednostkową; analogicznie możemy zapisać ruch obrotowy wzdłuż kierunku osi y i osi z.

możemy użyć sił uzyskanych w A do obliczenia całkowitego momentu obrotowego doświadczanego przez cząsteczkę przemieszczającą się z prędkością jednostkową w kierunku każdej osi.

C $\vec{T}_O \stackrel{\text{def}}{=} \sum_{i=1}^n \vec{r}_i \times \vec{f}_i$

możemy wykorzystać prędkości uzyskane w B do obliczenia sił działających na cząsteczkę obracającą się z prędkością jednostkową wzdłuż kierunku każdej osi.

D $\begin{pmatrix} \vec{f}_1 \\ \vdots \\ \vec{f}_n \end{pmatrix} = - \begin{pmatrix} \hat{Q}_{11} & \cdots & \hat{Q}_{n1} \\ \vdots & \cdots & \vdots \\ \hat{Q}_{1n} & \cdots & \hat{Q}_{nn} \end{pmatrix} \cdot \begin{pmatrix} \vec{v}_1 \\ \vdots \\ \vec{v}_n \end{pmatrix}$

$$\begin{pmatrix} \vec{F} \\ \vec{T}_O \end{pmatrix} = - \begin{pmatrix} \hat{\Theta}_t & \hat{\Theta}_{c,O}^\dagger \\ \hat{\Theta}_{c,O} & \hat{\Theta}_{r,O} \end{pmatrix} \cdot \begin{pmatrix} \vec{u}_O \\ \vec{\omega} \end{pmatrix}$$

$$[(\hat{\Theta}_t)_{1j}, (\hat{\Theta}_t)_{2j}, (\hat{\Theta}_t)_{3j}] = \vec{F} := \sum_{i=1}^n \vec{f}_i = -\hat{\Theta}_t \vec{u}_{O,j}; \quad \text{for } j=x, y, z$$

$$[(\hat{\Theta}_{c,O})_{1j}, (\hat{\Theta}_{c,O})_{2j}, (\hat{\Theta}_{c,O})_{3j}] = \vec{T}_O := \sum_{i=1}^n \vec{r}_i \times \vec{f}_i = -\hat{\Theta}_{c,O} \vec{u}_{O,j}; \quad \text{for } j=x, y, z$$

$$\hat{D} = \begin{pmatrix} \hat{D}_t & \hat{D}_{c,O}^\dagger \\ \hat{D}_{c,O} & \hat{D}_{r,O} \end{pmatrix} = k_B T \cdot \begin{pmatrix} \hat{\Theta}_t & \hat{\Theta}_{c,O}^\dagger \\ \hat{\Theta}_{c,O} & \hat{\Theta}_{r,O} \end{pmatrix}^{-1}$$

centrum oporu (CR), centrum dyfuzji (CD), zależność od położenia centrum układu współrzędnych cząstki (O).

$$x_{CD} = \frac{D_{c,23} - D_{c,32}}{D_{r,22} + D_{r,33}}; \quad y_{CD} = \frac{D_{c,31} - D_{c,13}}{D_{r,11} + D_{r,33}}; \quad z_{CD} = \frac{D_{c,12} - D_{c,21}}{D_{r,11} + D_{r,22}}$$

$$\vec{\mu} = \sum_i q_i \vec{r}_i$$

$$\mu_x' = \int_{-\Phi/2}^{\Phi/2} R^2 \sigma_{\text{eff}} \cos(\phi) d\phi$$

$$\mu_x' = \frac{\sin(\Phi/2) R Q}{\Phi/2}$$

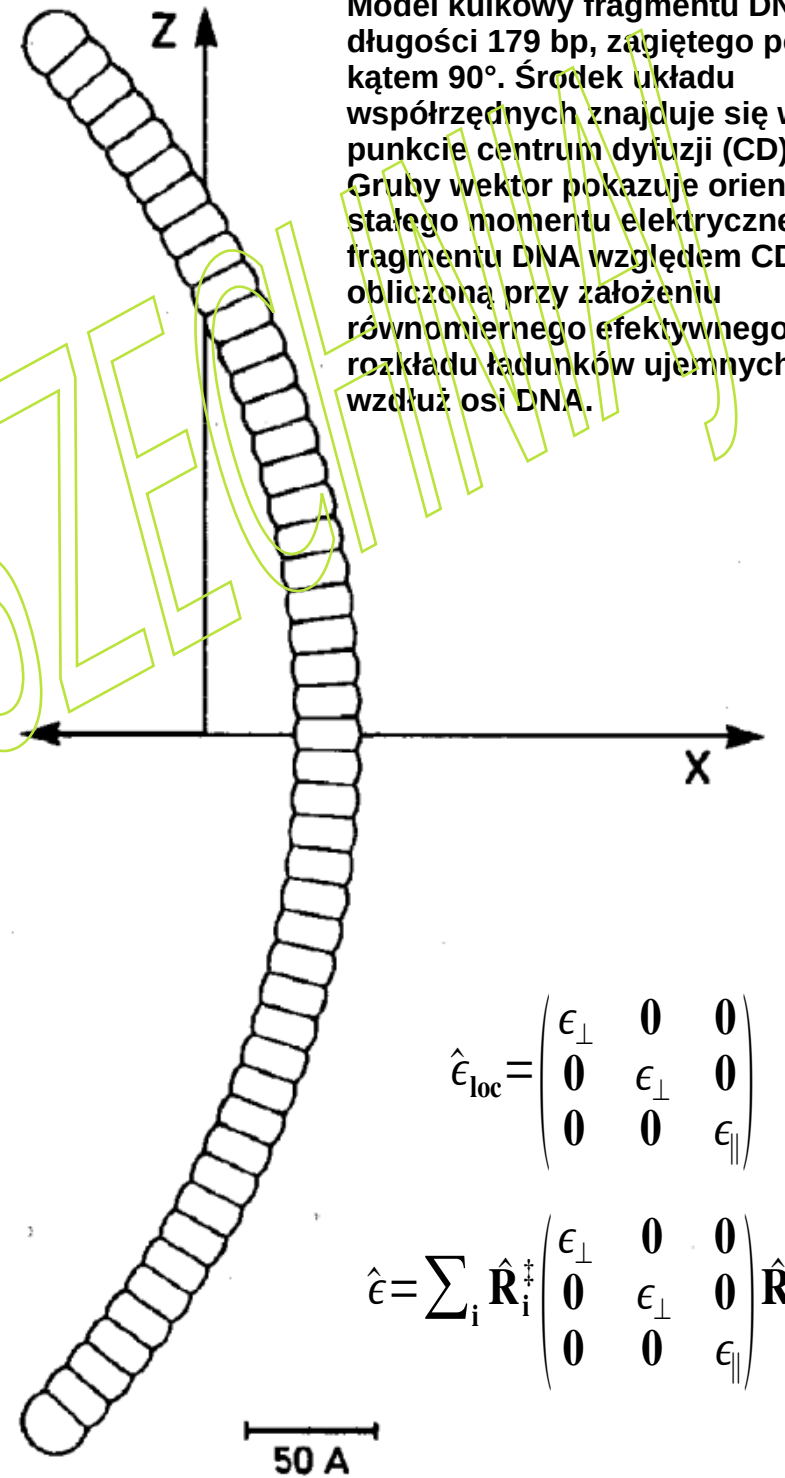
$$\mu_x = \mu_x' - x_{\text{CD}} Q$$

Tutaj: σ_{eff} to efektywna gęstość ładunku wzdłuż osi DNA, R promień, Φ kąt zgięcia, a Q całkowity ładunek DNA (uwzględnia się przesłanianie przez przeciwjony)

Polaryzacja elektryczna i absorpcja światła:

$$\hat{\alpha}_{\text{loc}} = \begin{pmatrix} 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & \alpha \end{pmatrix}$$

$$\hat{\alpha} = \sum_i \begin{pmatrix} \cos \theta_i & 0 & -\sin \theta_i \\ 0 & 1 & 0 \\ \sin \theta_i & 0 & \cos \theta_i \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & \alpha \end{pmatrix} \begin{pmatrix} \cos \theta_i & 0 & \sin \theta_i \\ 0 & 1 & 0 \\ -\sin \theta_i & 0 & \cos \theta_i \end{pmatrix}$$



Model kulkowy fragmentu DNA o długości 179 bp, zagiętego pod kątem 90°. Środek układu współrzędnych znajduje się w punkcie centrum dyfuzji (CD). Gruby wektor pokazuje orientację stałego momentu elektrycznego fragmentu DNA względem CD, obliczoną przy założeniu równomiernego efektywnego rozkładu ładunków ujemnych wzdłuż osi DNA.

$$\hat{\epsilon}_{\text{loc}} = \begin{pmatrix} \epsilon_{\perp} & 0 & 0 \\ 0 & \epsilon_{\perp} & 0 \\ 0 & 0 & \epsilon_{\parallel} \end{pmatrix}$$

$$\hat{\epsilon} = \sum_i \hat{\mathbf{R}}_i^{\dagger} \begin{pmatrix} \epsilon_{\perp} & 0 & 0 \\ 0 & \epsilon_{\perp} & 0 \\ 0 & 0 & \epsilon_{\parallel} \end{pmatrix} \hat{\mathbf{R}}_i$$

Środek układu współrzędnych cząstki zostaje przesunięty do środka dyfuzji (CD) badanej cząsteczki. Tensor dyfuzji rotacyjnej jest diagonalizowany, wyznaczone są jego osie własne, a układ współrzędnych cząstki jest obracany tak, aby pokrywał się z tymi osiami.

$$\hat{D}_{CD} = \begin{pmatrix} \hat{D}_t & \hat{D}_{c,CD}^\dagger \\ \hat{D}_{c,CD} & \hat{D}_{r,CD} \end{pmatrix}$$

$$\hat{D}_{r,0} \Rightarrow \hat{D}_{r,CD} \Rightarrow \begin{pmatrix} D_1 & 0 & 0 \\ 0 & D_2 & 0 \\ 0 & 0 & D_3 \end{pmatrix} = \hat{R}^\dagger \hat{D}_{r,CD} \hat{R}$$

Wszystkie pozostałe macierze i wektory są przekształcane do układu osi własnych tensora dyfuzji rotacyjnej.

Amplitudy i stałe czasowe krzywych postępu reakcji zaniku dichroizmu obliczono w sposób opisany przez Wegenera i in. (1979). Nie przeprowadza się żadnych symulacji dynamiki Browna. Zgodnie z teorią Wegenera i in. zanik dichroizmu roztworu sztywnych cząstek o dowolnym kształcie jest ogólnie opisywany sumą pięciu funkcji wkładczych.

τ	E_τ		
	$D_1 \neq D_2 \neq D_3$	$D_1 = D_2 < D_3$	$D_1 = D_2 > D_3$
-2	$3(D + D_3)$	$2D_1 + 4D_3$	$2D_1 + 4D_3$
-1	$3(D + D_2)$	$5D_1 + D_3$	$5D_1 + D_3$
0	$6D - 2\Delta$	$6D_1$	$2D_1 + 4D_3$
1	$3(D + D_1)$	$5D_1 + D_3$	$5D_1 + D_3$
2	$6D + 2\Delta$	$2D_1 + 4D_3$	$6D_1$

$D_1 \neq D_2 \neq D_3$

$$O_{-2} I_{-2} = 3 \epsilon_{12} \chi_{12}$$

$$O_{-1} I_{-1} = 3 \epsilon_{13} \chi_{13}$$

$$O_0 I_0 = (3/4)(c/M)^2 (\epsilon_{11} - \epsilon_{22})(\chi_{11} - \chi_{22})$$

$$-(\sqrt{3}/4)(bc/M^2) [(\epsilon_{11} - \epsilon_{22})(3\chi_{33} - \text{Tr } \chi) + (\chi_{11} - \chi_{22})(3\epsilon_{33} - \text{Tr } \epsilon)]$$

$$-(1/4)(b/M)^2 (3\chi_{33} - \text{Tr } \chi)(3\epsilon_{33} - \text{Tr } \epsilon)$$

$$O_1 I_1 = 3 \epsilon_{23} \chi_{23}$$

$$O_2 I_2 = (3/4)(b/M)^2 (\epsilon_{11} - \epsilon_{22})(\chi_{11} - \chi_{22})$$

$$+(\sqrt{3}/4)(bc/M^2) [(\epsilon_{11} - \epsilon_{22})(3\chi_{33} - \text{Tr } \chi) + (\chi_{11} - \chi_{22})(3\epsilon_{33} - \text{Tr } \epsilon)]$$

$$+(1/4)(c/M)^2 (3\chi_{33} - \text{Tr } \chi)(3\epsilon_{33} - \text{Tr } \epsilon)$$

$$\xi(t) = \sum_{\tau=-2}^2 O_\tau I_\tau \exp(-E_\tau t)$$

$D_1 = D_2 < D_3$

$$O_0 I_0 = (1/4)(3\chi_{33} - \text{Tr } \chi)(3\epsilon_{33} - \text{Tr } \epsilon)$$

$$O_1 I_1 + O_{-1} I_{-1} = 3(\epsilon_{13} \chi_{13} + \epsilon_{23} \chi_{23})$$

$$O_2 I_2 + O_{-2} I_{-2} = 3\epsilon_{12} \chi_{12} + (3/4)(\epsilon_{11} - \epsilon_{22})(\chi_{11} - \chi_{22})$$

$D_1 = D_2 > D_3$

$$O_0 I_0 = (1/4)(3\chi_{33} - \text{Tr } \chi)(3\epsilon_{33} - \text{Tr } \epsilon)$$

$$O_1 I_1 + O_{-1} I_{-1} = 3(\epsilon_{13} \chi_{13} + \epsilon_{23} \chi_{23})$$

$$O_2 I_2 + O_{-2} I_{-2} = 3\epsilon_{12} \chi_{12} + (3/4)(\epsilon_{11} - \epsilon_{22})(\chi_{11} - \chi_{22})$$

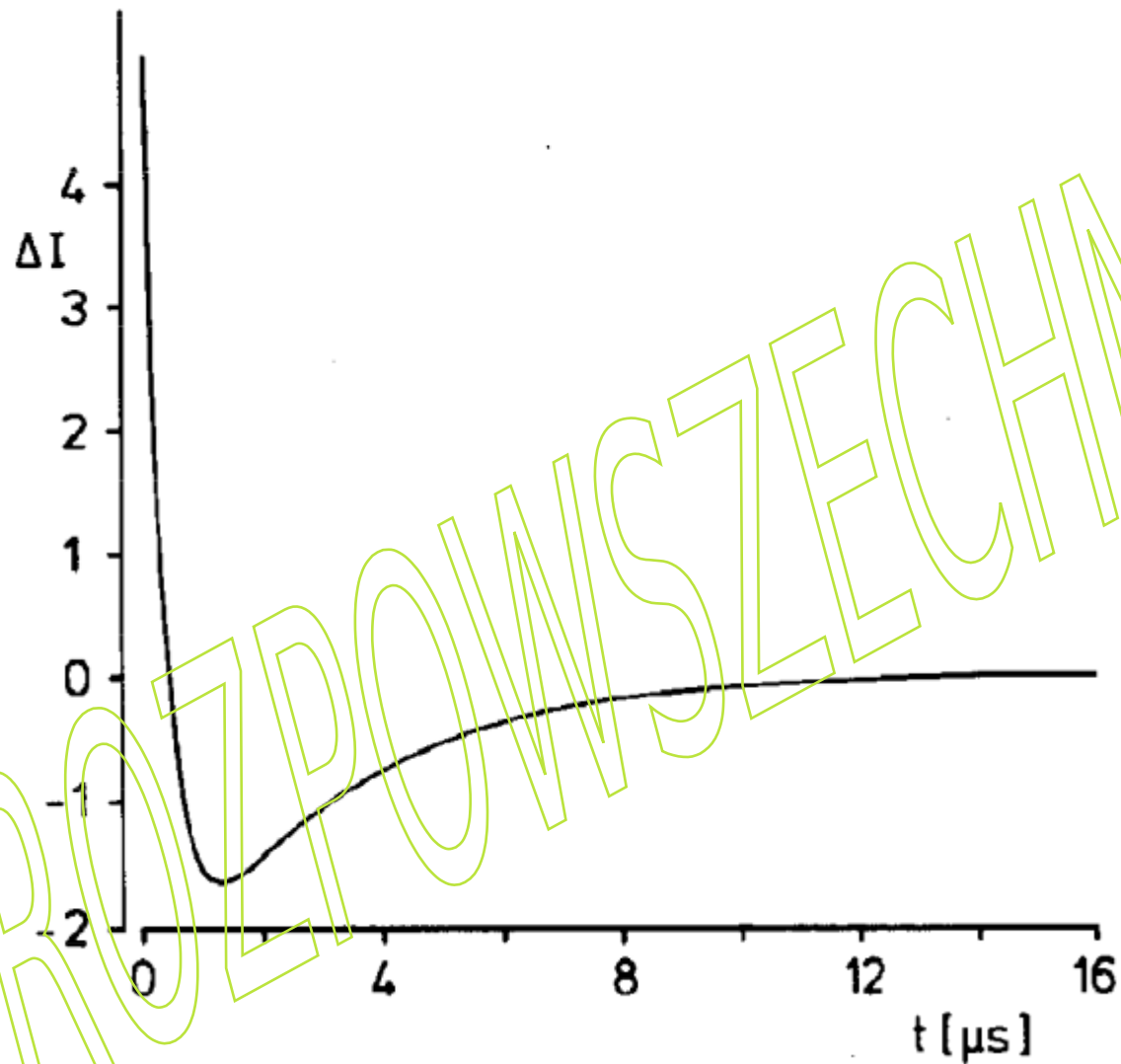
$$\chi_{ij} = \beta^2 \mu_i \mu_j + \beta \alpha_{ij}; \quad \beta = \frac{1}{kT}$$

$$b = 3(D_3 - D) + 2\Delta; \quad c = \sqrt{3}(D_1 - D_2)$$

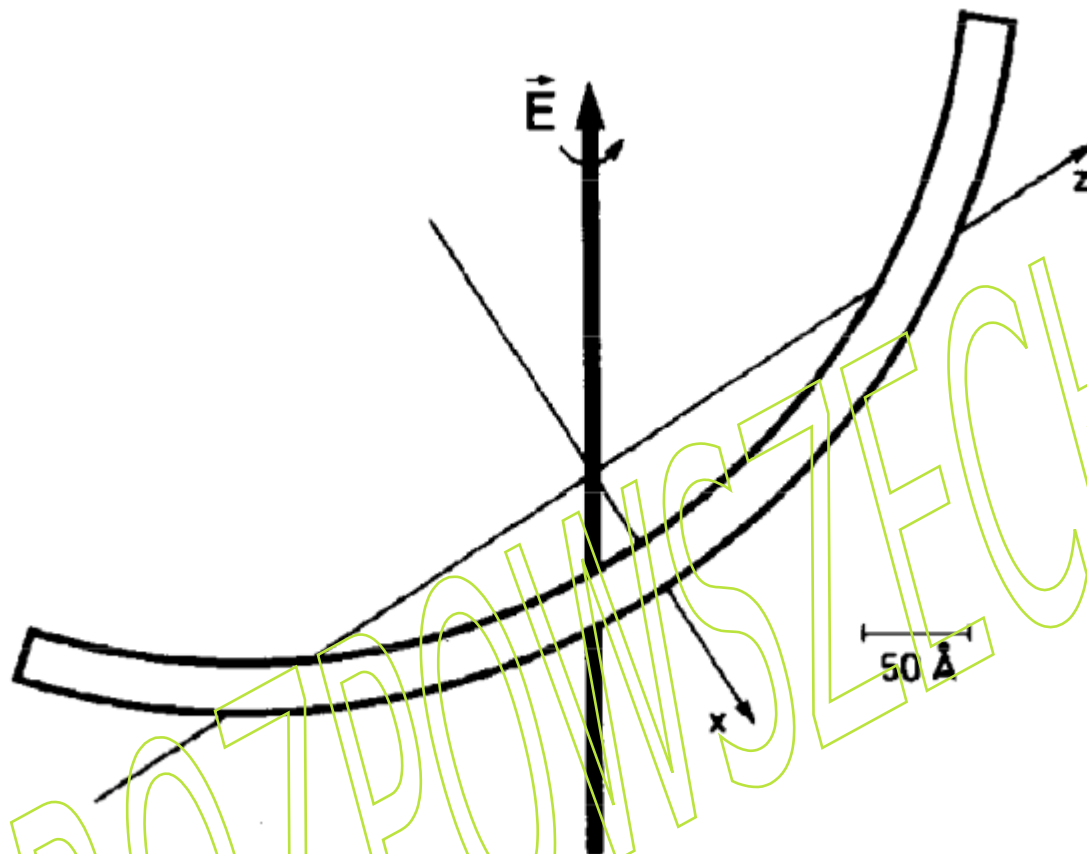
$$M = 2(\Delta b)^{1/2}; \quad b^2 + c^2 = M^2$$

$$\Delta = (D_1^2 + D_2^2 + D_3^2 - D_1 D_2 - D_2 D_3 - D_1 D_3)^{1/2}$$

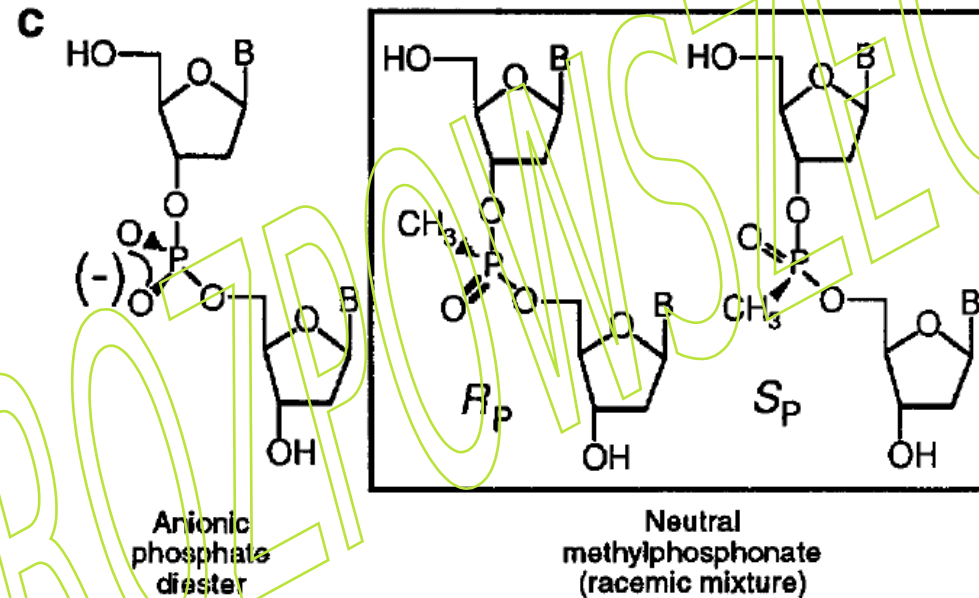
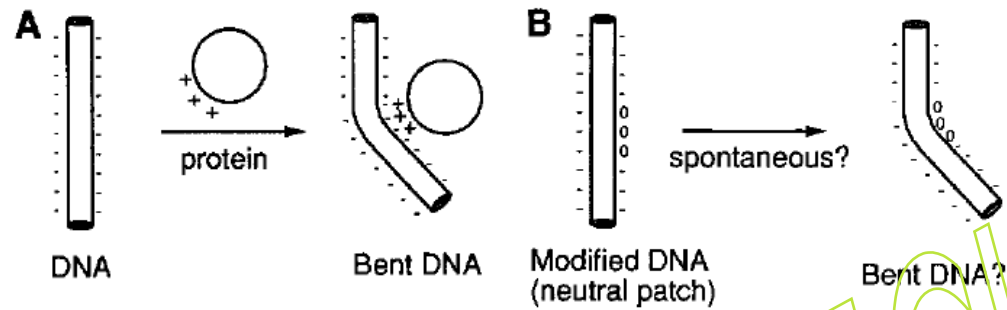
$$D = (1/3)(D_1 + D_2 + D_3) \equiv (1/3) \text{Tr } \hat{D}$$



Krzywa zaniku dichroizmu (zmiana natężenia światła ΔI w arbitralnych jednostkach w funkcji czasu t) obliczona dla fragmentu o długości 179 bp przy kącie zagięcia 100° (efektywny ładunek grup fosforanowych 12% ładunku elementarnego, polaryzowalność wyprostowanego DNA $5.09 \times 10^{-33} \text{ Cm}^2 \text{V}^{-1}$; 20°C).

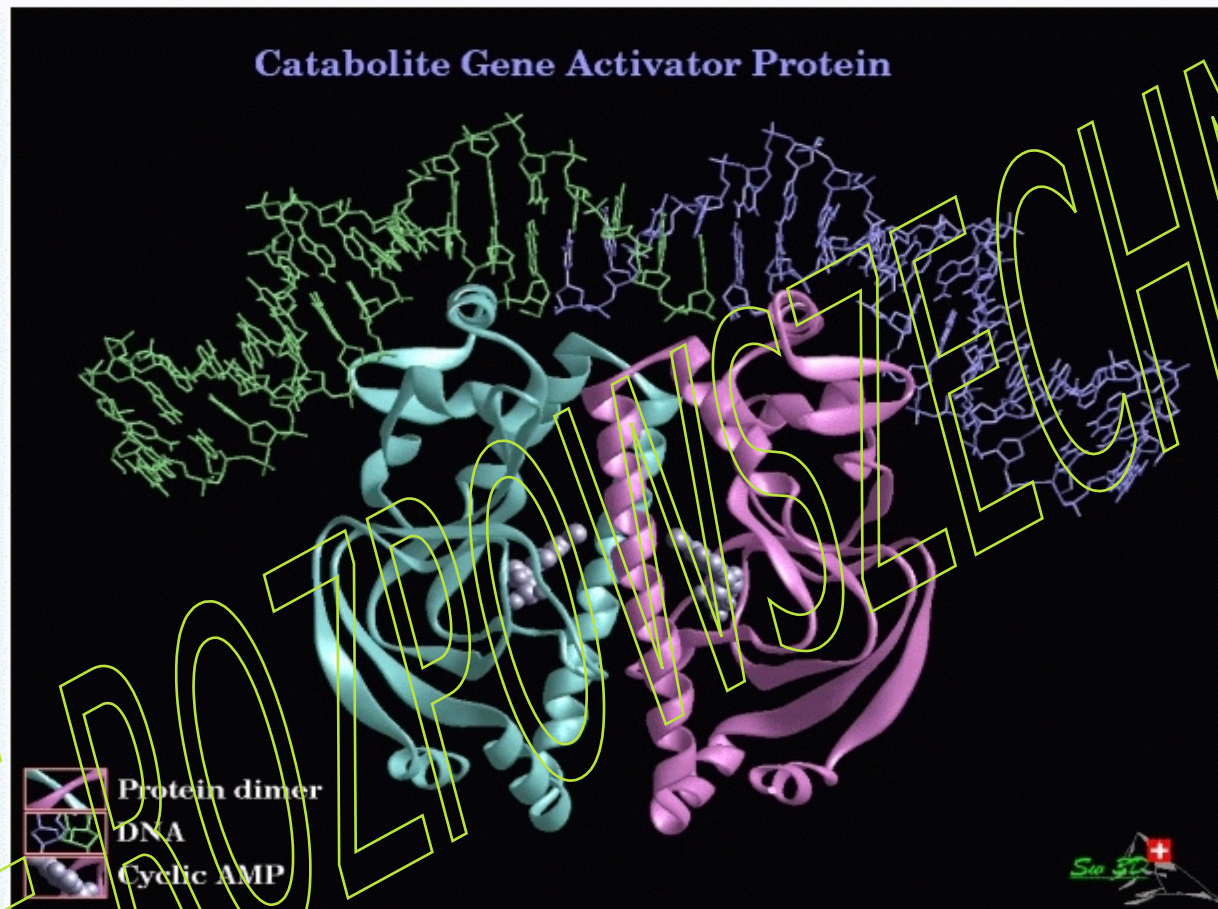


Stacjonarne ułożenie fragmentu DNA o długości 179 bp pod kątem zagięcia 100° (parametry elektryczne jak na rysunku na poprzednim slajdzie) indukowanego polem elektrycznym E . Należy zauważyć, że osie molekularne (x i z) wektor pola E i zakrzywiony łuk DNA, położone są w tej samej płaszczyźnie. Strzałka wokół wektora pola wskazuje, że wszystkie pozycje DNA poza płaszczyzną, wynikające z obrotu wokół wektora pola, są jednakowo prawdopodobne. Zredukowany dichroizm ograniczający obliczony dla tego przypadku wynosi $-0,09$. Po zakończeniu impulsu cząsteczki najpierw stosunkowo szybko obracają się wokół osi z , co prowadzi do odwrócenia dichroizmu do $+0,05$. W końcu cząsteczki są rozmieszczone losowo (zero dichroizmu) poprzez stosunkowo powolny obrót wokół osi x .



Wiele białek wiążących DNA kieruje swoje kationowe powierzchnie w stronę DNA (A). Stopień, w jakim zagięcie DNA wynika z neutralizacji fosforanów, można określić, wyłączając ładunki fosforanowe na jednej stronie DNA, a następnie mierząc kształt powstałego duplexu DNA (B). Jedną ze strategii tworzenia takiego modelu wymaga syntezy chemicznej oligonukleotydów zawierających specyficzne dla miejsca podstawienia analogów obojętnych fosforanów zamiast naładowanych fosforanów. W tym celu wybrano obojętne wiązanie międzynukleozydowe metylofosforanu (w którym grupa metylowa jest podstawiona za jeden z niemostrujących atomów tlenu w fosforanach) (C). Oczekiwanie to potwierdzają wyniki eksperymentów elektroforetycznych. Elektroforeza to ruch rozproszonych cząstek względem płynu pod wpływem przestrzennie jednorodnego pola elektrycznego.

Kompleks DNA z białkiem CAP

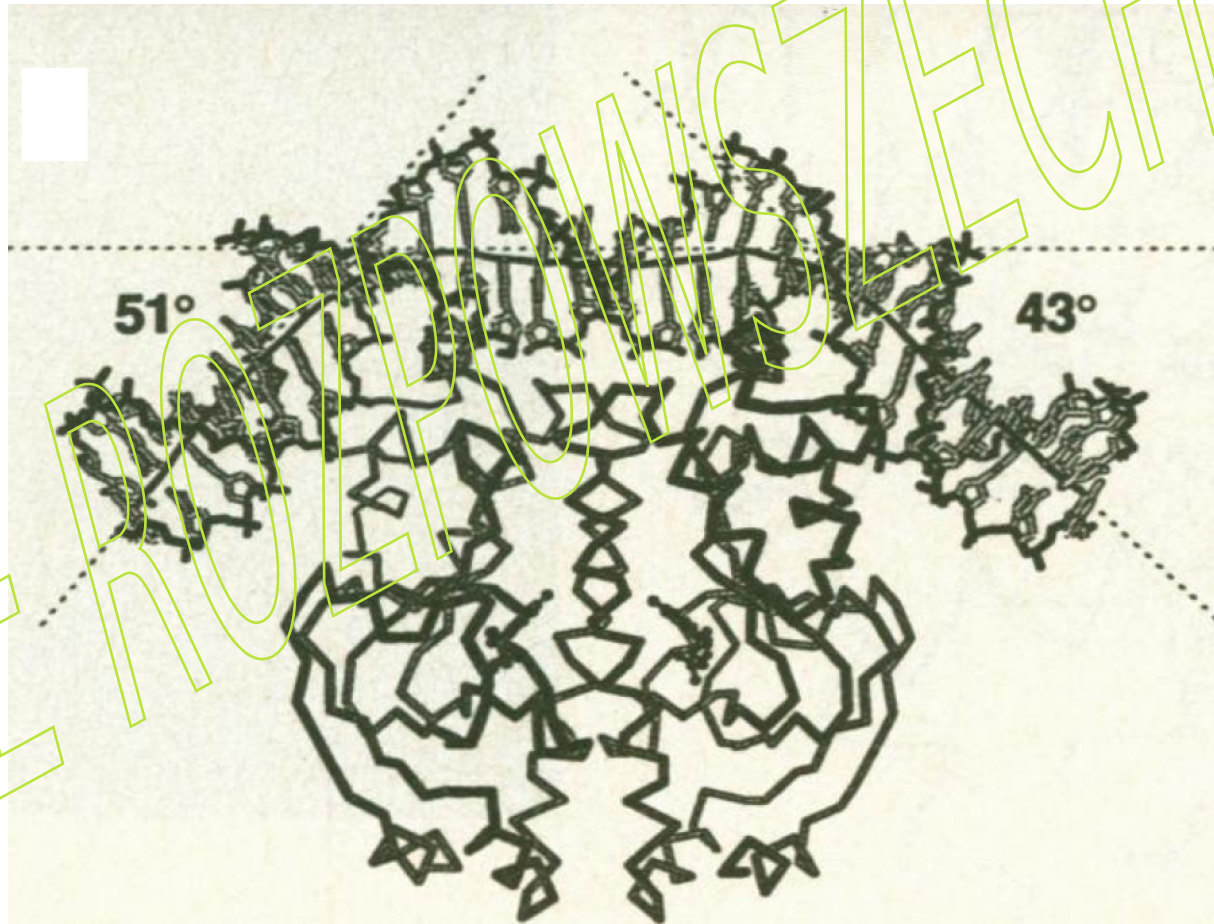


Białko receptorowe cAMP (CRP; znane również jako białko aktywujące gen katabolitu, CAP od **C**atabolite **A**ctivator **P**rotein) jest białkiem regulatorowym w bakteriach.

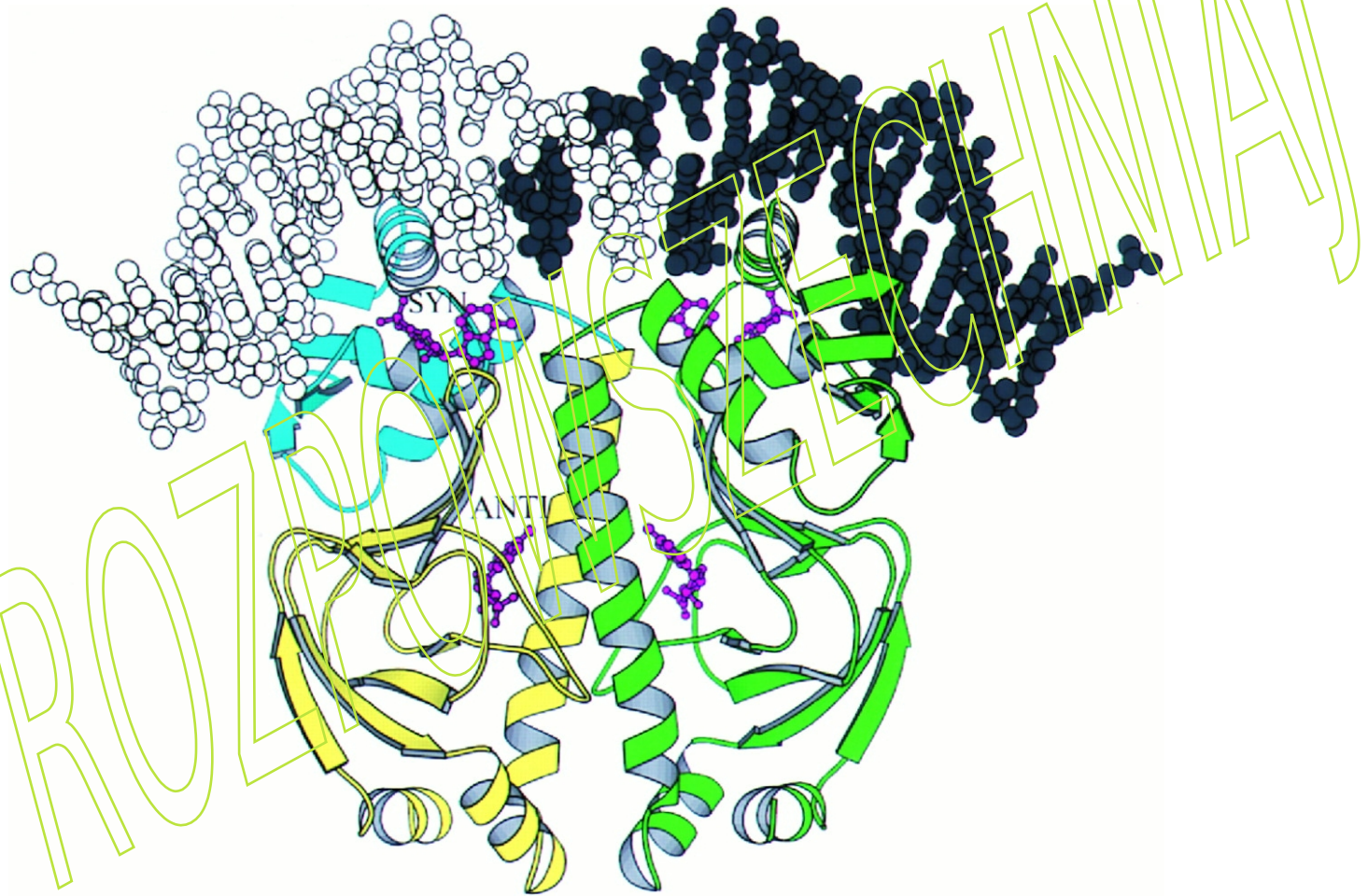
Białko CAP kontroluje ekspresję kilku genów *E. coli*. Wiązanie CAP ze specyficznymi miejscami promotorowymi w obecności cAMP indukuje transkrypcję genów kodujących enzymy katabolizmu laktozy, arabinozy, maltozy i innych cukrów. Mechanizm aktywacji przez CAP na poziomie molekularnym jest przedmiotem ogólnego zainteresowania jako przykład regulacji genów.

Kąt zagięcia DNA w kompleksie CAP-DNA.

Struktura krystaliczna białka aktywatora genu katabolitu (CAP) *Escherichia coli* o rozdzielczości 3 angstrémów skompleksowana z sekwencją DNA o długości 30 par zasad. Trzy grupy boczne wychodzące z helisy rozpoznającej ("recognition helix") motywu heliza-skręt-helisa (helix-turn-helix motif) w strukturze białka CAP oddziałują poprzez wiązania wodorowe bezpośrednio z trzema parami zasad w głównym rowku DNA. Oś helisy DNA jest pokazana jako czarna linia biegnąca przez środek helisy. Helisy rozpoznające białka CAP są prostopadłe do płaszczyzny strony I są widoczne pod linią rozciągającą się wzdłuż środkowych dziesięciu par zasad. Zmierzone kąty są pokazane na rysunku. Razem dają to kąt zagięcia DNA wynoszący 90°.



J. M. Passner and T. A. Steitz, The structure of a CAP–DNA complex having two cAMP molecules bound to each monomer, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 94, pp. 2843-2847, 1997



Model wstępny (ribbon drawing) dimeru białka CAP, z dwiema molekułami cAMP na monomer (magenta), jedną oznaczoną jako SYN i drugą jako ANTI, w kompleksie z DNA. W jednym monomerze większa domena N-końcowa jest żółta, a mniejsza domena C-końcowa jest niebieska, podczas gdy z nią połączona sekwencja wiążąca DNA jest jasnoszara. Druga podjednostka jest zielona, a z nią złączona DNA jest ciemnoszara. Syn-cAMP leży na linii helisa-zwrot-helisa, blisko DNA i pętli od domeny N-końcowej. Sekwencja połowki wiążącej DNA jest 5'-ATGTCACATTAATTGCGTTGCGC-3'.

Inne metody eksperymentalne zastosowane do analizy kompleksów CAP-DNA

Mean DNA Bend Angle and Distribution of DNA Bend Angles in the CAP-DNA Complex in Solution, A. N. Kapanidis, Y. W. Ebright, R. D. Ludescher, S. Chan and R. H. Ebright, J. Mol. Biol. (2001) 312, 453-468.

Pomiary przesunięcia ruchliwości elektroforetycznej,¹²⁻¹⁷ pomiary elektro-optyczne (omówione szczegółowo w dalszej części),¹⁸⁻²⁰ pomiary cyklizacji,²¹⁻²³ i pomiary topologiczne²⁴ potwierdzają, że CAP ostro zagina DNA w roztworze i dają szacunki średniego kąta zagięcia DNA w kompleksie CAP-DNA w roztworze w zakresie od ~70 do ~180°. W celu określenia średniego kąta zgięcia DNA i rozkładu kątów zgięcia DNA w kompleksie białko aktywujące katabolit (CAP)-DNA w roztworze w standardowych warunkach inicjacji transkrypcji, wykonaliśmy pomiary fluorescencji w czasie nanosekundowym, określając ilościowo transfer energii pomiędzy włączoną sondą w określonym miejscu CAP oraz sondę komplementarną wbudowaną w każdym z pięciu określonych miejsc DNA (pomiary FRET). Badania wykazują, że górna granica rozkładu kątów zagięcia DNA w kompleksach z CAP wynosi około 100°.

Turn of Promotor DNA by cAMP Receptor Protein Characterized by Bead Model Simulation of Rotational Diffusion

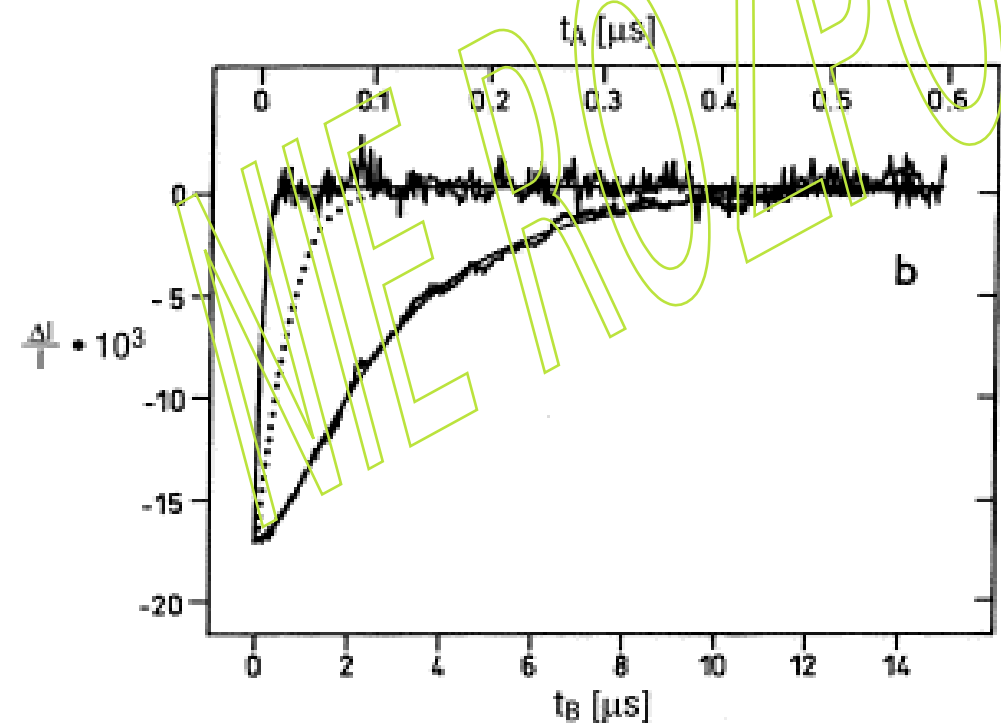
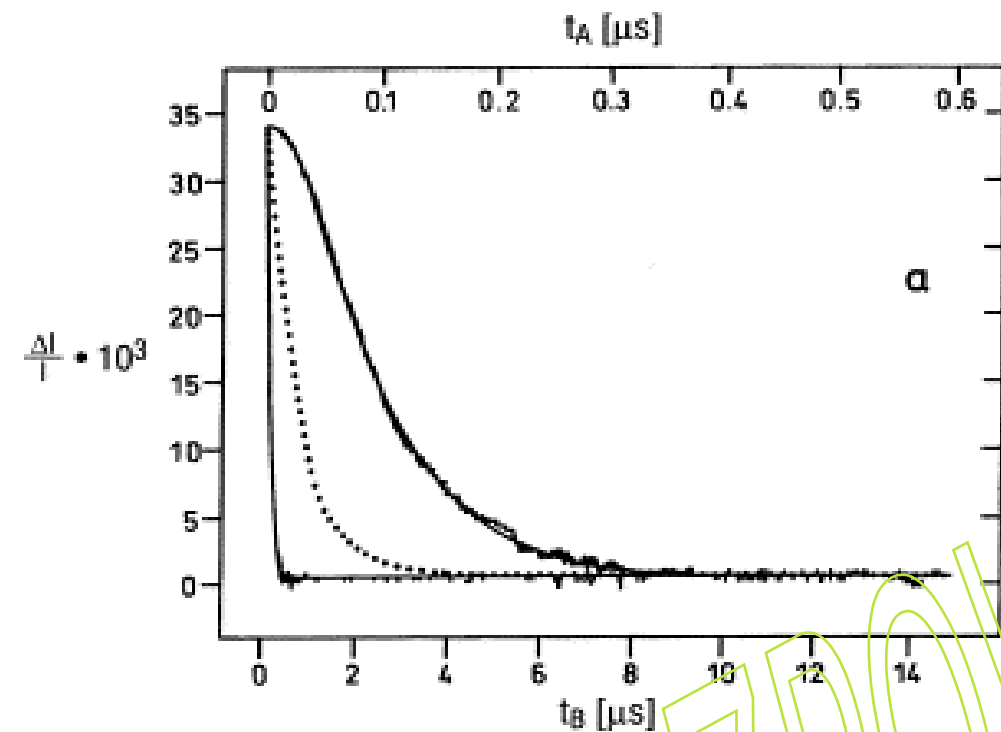
(J. Antosiewicz, D. Porschke, J. Biomolec. Struct. Dyn., 5:819-837, 1988)

Chociaż represję genów można łatwo uwidocznic na podstawie zawady przestrzennej wynikającej z zajęcia miejsca inicjacji przez cząsteczkę represora, aktywacja genów wymaga innych mechanizmów. W przypadku CAP aktywacja transkrypcji genu wydaje się być powiązana z indukcją specjalnej konformacji DNA. Pierwszy dowód pochodzi z niezwykle niskiej mobilności specyficznych kompleksów CAP-DNA w elektroforezie żelowej, co wyjaśniono zakrzywieniem podwójnej helisy DNA.

Ponieważ nie udało się jeszcze ustalić ilościowej teorii migracji makrocząsteczek w żelach, ruchliwość elektroforetyczna w żelu jest otwarta na różne interpretacje. Bardziej bezpośrednią interpretację można podać dla danych eksperymentalnych uzyskanych metodami elektrooptycznymi. Na podstawie pomiarów dichroizmu elektrycznego można wyznaczyć stałe czasowe rotacji, o których wiadomo, że są niezwykle wrażliwe na zmiany wymiarów molekularnych. Podejście to zastosowano do analizy specyficznych kompleksów CRP-DNA*. Zaobserwowane silne zmniejszenie stałych czasowych rotacji DNA po związaniu CRP w obecności cAMP wykazało, że specyficzne białkowe kompleksy DNA są bardzo zwarte i DNA musi być silnie zagięte przez białko.

Jednakże stopień zagięcia DNA pozostaje do oceny. Do tej oceny szczególnie przydatne powinny być eksperymentalne stałe czasowe rotacji, ponieważ współczynniki dyfuzji rotacyjnej są bardzo silnie zależne od kształtu cząsteczki i można je obliczyć dla obiektów o dowolnym kształcie na podstawie modeli kulek. W naszym obecnym badaniu czasy relaksacji rotacyjnej obliczono dla różnych modeli kompleksów CRP-DNA i porównano z danymi eksperymentalnymi.

*D. Porschke, W. Hillen and M. Takahashi, EMBO J. 3, 2873 (1984)

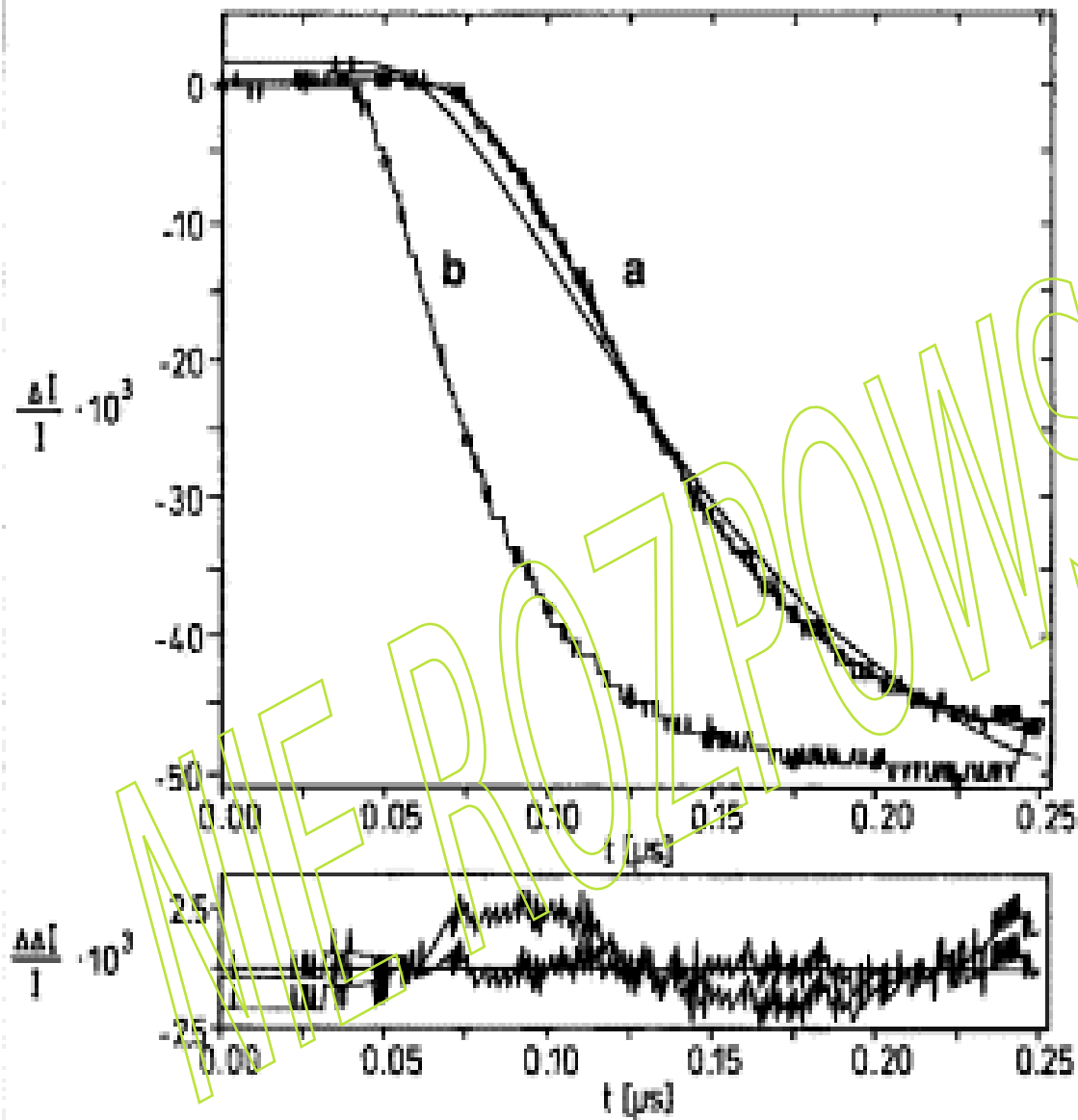


Zmiana natężenia światła spolaryzowanego równoległe do wektora pola E po zakończeniu impulsu pola elektrycznego o wartości 70 kV/cm (a) dla wolnego DNA o długości 40 bp i (b) kompleksu DNA o długości 40 bp z cyklicznym receptorem AMP ($\lambda=248$ nm; 20°C); linie z szumem reprezentują dane eksperymentalne, linie bez szumu przedstawiają dopasowania metodą najmniejszych kwadratów przez pojedyncze wykładniki (a, 73 ns; b, 102 ns); zanik dichroizmu przedstawiono w dwóch różnych skalach czasowych t_A i t_B ; należy zwrócić uwagę, że początkowy sigmoidalny kształt krzywych zaniku wynika ze splotu, głównie ze względu na ograniczoną szerokość pasma systemu detekcji; linie przerywane to odniesienia do dekonwolucji (uzyskane przez pomiary dwójłomności z buforem), stosowane w procedurze dopasowywania wykładniczego.

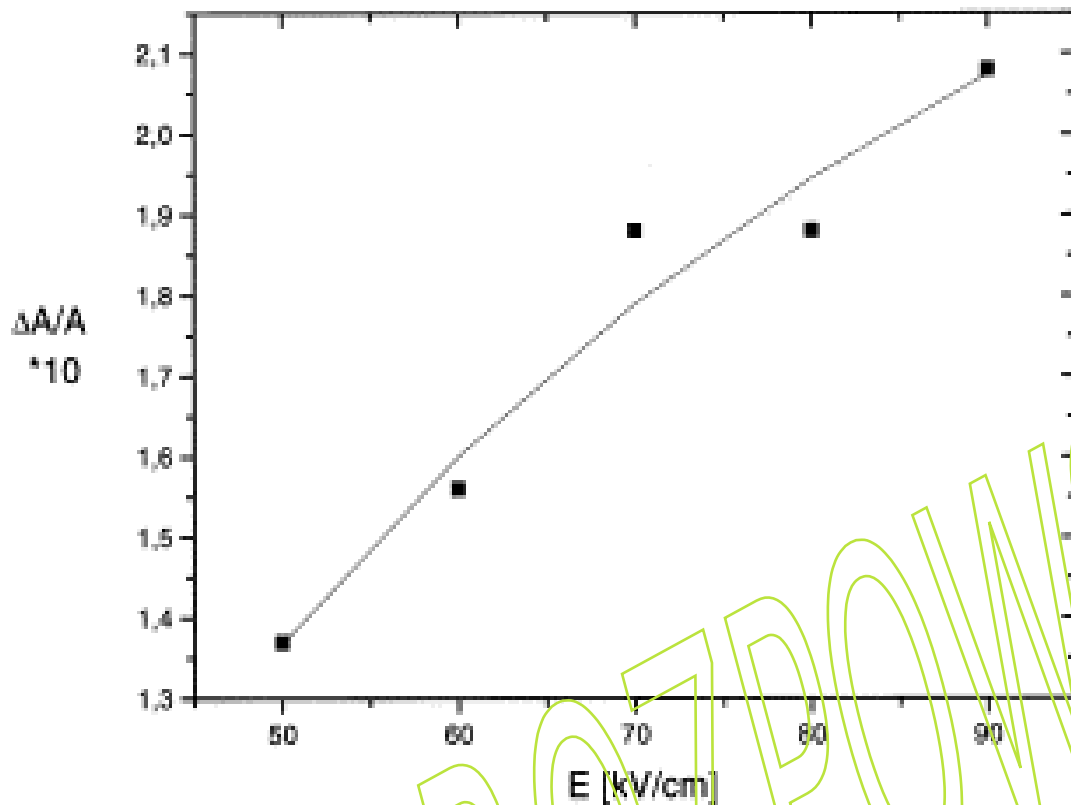
Cykliczny receptor AMP nie wykazywał żadnego mierzalnego dichroizmu elektrycznego. Absorbancja białka przy 248 nm jest znikoma w porównaniu z absorbancją DNA, dlatego dichroizm jest określany przez obecne w kompleksie DNA.

Jak pokazują krzywe zaniku dichroizmu przedstawione na rysunku, związanie białka z fragmentem DNA prowadzi do zmiany znaku dichroizmu: dichroizm elektryczny wolnego fragmentu DNA jest jak zwykle ujemny (a), natomiast kompleks z białkiem wykazuje dodatni dichroizm (b).

Godne uwagi jest to, że czas zaniku dichroizmu dla kompleksu jest tylko nieznacznie większy niż dla wolnego DNA, chociaż objętość kompleksu jest znacznie większa niż objętość wolnego DNA.

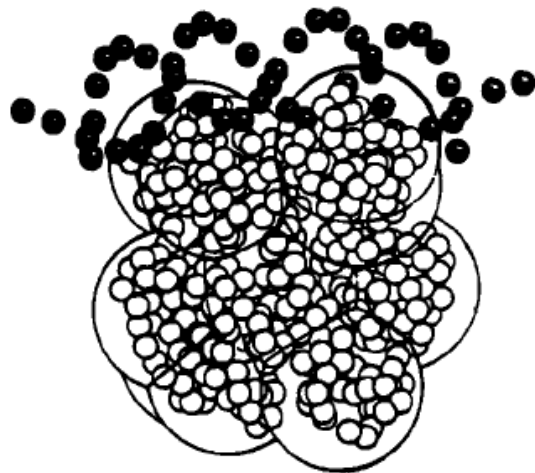


Krzywa wzrostu dichroizmu dla kompleksu cyklicznego receptora AMP z promotorem o 30 par zasad, w temperaturze 20°C, indukowanego impulsem pola elektrycznego o wartości 80 kV/cm (bufor standardowy). Krzywa a jest krzywą wzrostu dichroizmu i krzywa b jest krzywą odniesienia stosowaną do dekonwolucji (dwójłomność bufora); linia bez szumu, która jest zbliżona do krzywej narastania, ale wyraźnie odróżnia się od krzywej doświadczalnej, reprezentuje fit funkcji monoeksponencjalnej. Linii reprezentującej fit funkcji dwueksponencjalnej nie można odróżnić od krzywej wzrostu. Reszty z obu dopasowań wykładniczych są pokazane razem na dolnym panelu. Krzywe wzrostu wolnego DNA można dopasować za pomocą pojedynczych wykładników z zadowalającą dokładnością.

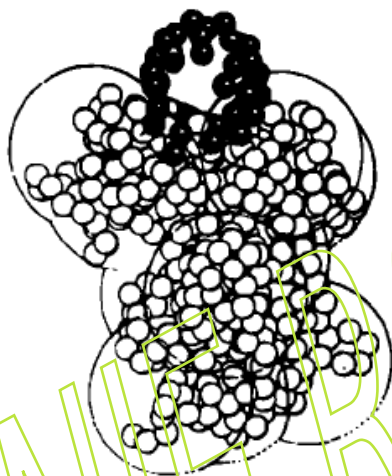


Zredukowany dichroizm $\Delta A/A$ dla kompleksu białka CAP i receptora DNA o długości 30 par zasad jako funkcja natężenia pola elektrycznego E (20°C); linia ciągła przedstawia fit modelu orientacji permanentnego momentu dipolowego ($\mu=3.0 \cdot 10^{-27}$ Cm, $(\Delta A/A)_\infty = +0.3$). Elektrooptyczne parametry otrzymane dla fragmentów promotora o długościach 30 i 40 bp par zasad i ich kompleksów z białkiem CAP przedstawia Tabela.

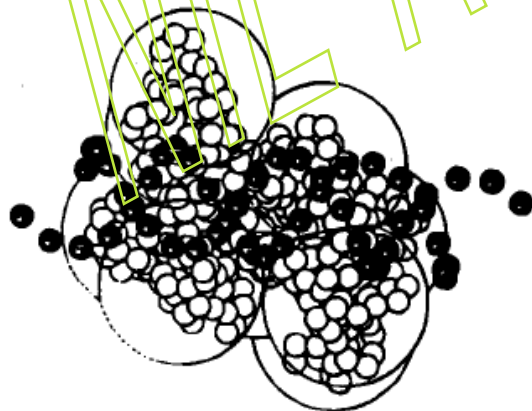
Sample	τ_d (2°C)	τ_d (20°C)	$(\Delta A/A)_\infty$
30 bp	86 ± 3	52 ± 3	-0.8 ± 0.2
CAP-30 bp	107 ± 5	62 ± 3	$+0.3 \pm 0.1$
40 bp	144 ± 6	80 ± 3	-1.0 ± 0.2
CAP-40 bp	188 ± 8	106 ± 4	Positive
203 bp	3600 ± 200	2300 ± 150	-1.2^a
CAP-203 bp	2200 ± 150	1300 ± 100	Negative



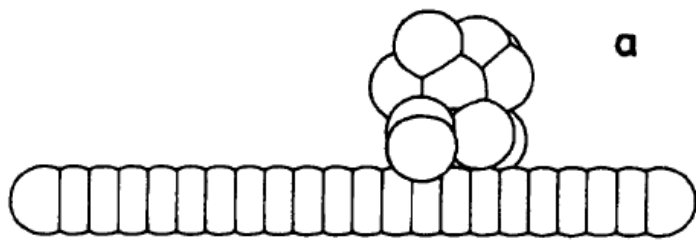
Hydrodynamiczny model białka CAP został zbudowany na podstawie są struktury rentgenowskiej opisanej przez przez McKaya i Steitza (Nature 290, 744 (1981)). CAP jest dimerem identycznych podjednostek, które składają się z dwóch domen. Domena N-końcowa o całkowitych wymiarach 25 x 30 x 35 Å wiąże cAMP i bierze udział w regulacji, podczas gdy zakłada się, że domena C-końcowa o przybliżonych wymiarach 20 x 20 x 30 Å wiąże się z DNA.



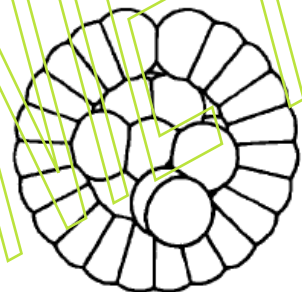
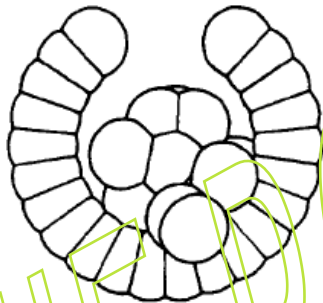
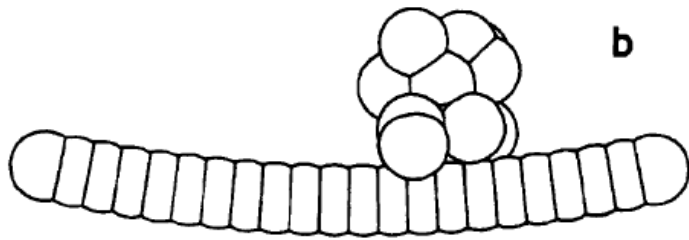
Z uwagi na ograniczenia w obliczeniach liczba kulek użytych do zbudowania modelu hydrodynamicznego CAP była ograniczona (13 koralików o promieniu 14.2 Å). Koraliki użyte do modelowania DNA i CAP nakładają się, więc wszystkie musiały mieć takie same promienie. Przygotowano trzy ortogonalne widoki struktury krystalicznej CAP. Koraliki rozmieszczono tak by atomy struktury krystalicznej CAP nie wystawały poza powierzchnię żadnego z koralików, tak by zespół koralików możliwie najbardziej przypominał kształt białka z trzech prostopadłych kierunków.



Bufory użyte w eksperymentach (D. Porschke, W. Hillen and M. Takahashi, EMBO J. 3, 2873 (1984)): T = 5mM Tris pH 8.0, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM 1,4-dithioerythritol; T10 = T + 10 mM NaCl;



J. Biomolec. Struct. Dyn., 5:819-850 (1988)



Modele kulkowe kompleksu utworzonego z CAP i fragmentu o długości 80 par zasad w buforze T10 (promień kulki 14,2 Å) przy różnych stopniach zagięcia DNA określonym przez promień łuku a) ∞ , b) 600 Å c) 50 Å and d) 44 Å.

Rotacyjne czasy relaksacji τ_i i względne amplitudy obliczone dla kompleksów CAP z DNA o długościach 62 i 80 par zasad, w buforach T i T10, jako funkcje promienia zagięcia podwójnej helisy DNA. Stałe czasowe $\bar{\tau}$ otrzymano z fitowania funkcji monoeksponencjalnej do obliczonej krzywej zaniku dichroizmu. Promień 44 Å to najniższa wartość, jaka jest możliwa według naszego modelu kulkowego w buforze T10. Stałe czasu relaksacji rotacyjnej mierzone (EMBO J. 3, 2873 (1984)) dla kompleksów białka CAP z fragmentami DNA bez i przy obecności cAMP podano w ostatniej linii dla porównania.

Fragment Buffer	62			80			80		
	A_1	τ_1	$\bar{\tau}$	A_1	τ_1	$\bar{\tau}$	A_1	τ_1	$\bar{\tau}$
straight	0.954	403		0.986	640		0.984	566	
	0.000	110		0.000	429		0.000	368	
	0.045	316	358	0.014	433	635	0.016	371	560
	0.000	187		0.000	218		0.000	181	
600	0.001	187		0.000	218		0.000	181	
	0.966	394		0.990	625		0.989	551	
	0.000	304		0.000	211		0.000	175	
	0.014	308	390	0.010	420	621	0.011	359	547
400	0.000	183		0.000	418		0.000	358	
	0.000	183		0.000	211		0.000	175	
	0.970	388		0.993	610		0.991	538	
	0.000	182		0.000	203		0.001	167	
300	0.029	305	385	0.006	406	606	0.007	346	534
	0.000	301		0.000	406		0.000	346	
	0.001	182		0.001	203		0.001	167	
	0.973	382		0.991	596		0.990	525	
200	0.000	181		0.002	399		0.004	340	
	0.025	300	378	0.002	399	584	0.001	340	519
	0.000	297		0.004	201		0.002	165	
	0.002	181		0.000	201		0.003	165	
100	0.972	367		0.973	563		0.973	495	
	0.001	179		0.002	388		0.002	330	
	0.017	292	362	0.000	389	538	0.000	331	474
	0.000	290		0.000	201		0.001	166	
50	0.010	179		0.024	201		0.024	166	
	0.788	312		0.471	438		0.473	383	
	0.047	179		0.000	352		0.126	185	
	0.003	264	273	0.000	353	290	0.001	303	249
44	0.000	262		0.246	223		0.000	302	
	0.162	179		0.283	223		0.400	185	
	0.002	200		0.005	230		0.002	194	
	0.027	168		0.003	208		0.000	180	
Experimental Time Constants	0.000	194	168	0.001	229	205	0.001	193	172
	0.000	187		0.001	214		0.008	175	
	0.971	167		0.991	205		0.989	172	
	0.000	166		0.005	154		0.000	166	151
	0.009	153		0.986	151				
Experimental Time Constants	-cAMP	430			560			520	
	+cAMP	250			560			130	

symulacja ruchów Browna cząstki sferycznej w polu siły zewnętrznej

$$\langle x^2 \rangle_{\text{random}} = 2 D_t t \quad D_t = \frac{kT}{\xi} = \frac{kT}{6\pi\eta\sigma} \quad v_{\text{forced}} = \frac{D_t F}{kT} (1 - e^{-(\xi t/m)}) \approx \frac{D_t F}{kT}$$

$$x(t+\Delta t) = x(t) + \frac{D_t F}{kT} \Delta t + \Delta x_{\text{random}} \quad \Delta x_{\text{random}} \in N(0, \sqrt{2 D_t \Delta t})$$

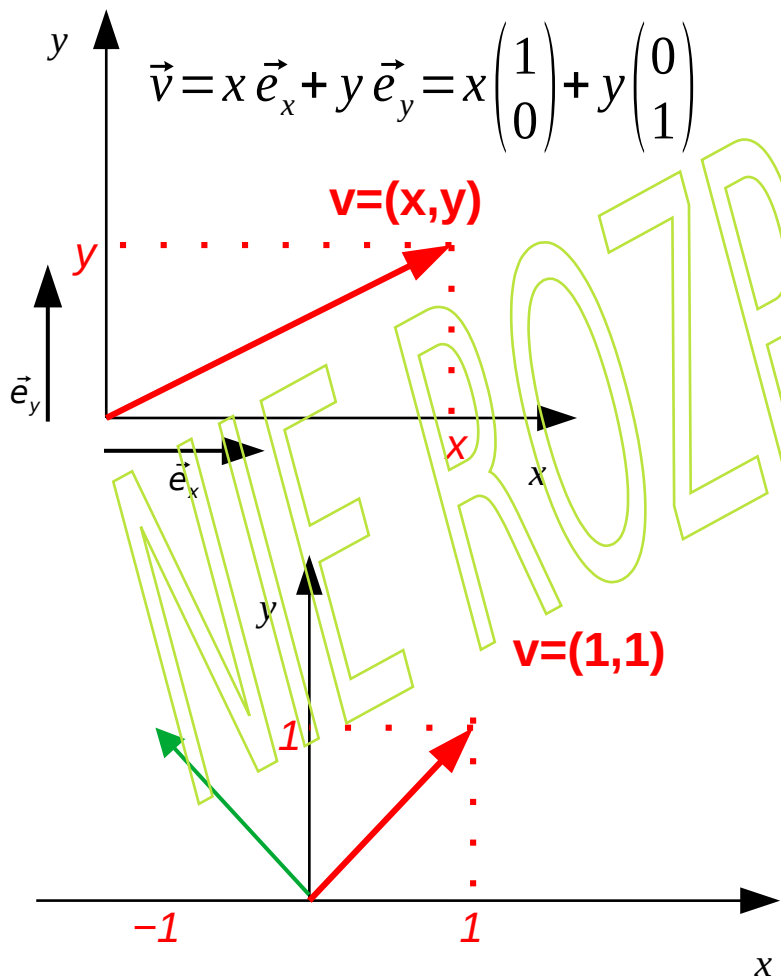
$$\vec{r}(t+\Delta t) = \vec{r}(t) + \frac{D_t \vec{F}}{kT} \Delta t + \Delta \vec{r}_{\text{random}} \quad \Delta \vec{r}_{i,\text{random}} \in N(0, \sqrt{2 D_t \Delta t}), \quad i=x, y, z$$

symulacja BD ruchu rotacyjnego:

Ruch obrotowy cząstki można opisać macierzami rotacji O_i dla każdego pojedynczego kroku rotacyjnego, co daje w rezultacie ogólną macierz rotacji O_I

$$O_I = O_i \cdot O_{i-1} \cdot \dots \cdot O_2 \cdot O_1$$

opisujący orientację cząstki względem układu współrzędnych odniesienia po I-tym kroku obrotowym. Jednakże ta procedura może prowadzić do kumulacji błędów: ze względu na ograniczoną dokładność komputera macierz rotacji O_I może po pewnej liczbie mnożeń nie być już ortogonalna. Dlatego w naszym obecnym badaniu używamy formalizmu wektorów rotacji do opisu ruchu obrotowego cząstek.



Macierz obrotu:

$$\vec{v}' = \hat{O}(\phi) \cdot \vec{v}$$

$$\begin{pmatrix} x' \\ y' \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \cos \phi & -\sin \phi \\ \sin \phi & \cos \phi \end{pmatrix} \cdot \begin{pmatrix} x \\ y \end{pmatrix}$$

Założmy:

$$\hat{O} = \begin{pmatrix} \cos(\pi/2) & -\sin(\pi/2) \\ \sin(\pi/2) & \cos(\pi/2) \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 0 & -1 \\ 1 & 0 \end{pmatrix} \quad \wedge \quad \begin{pmatrix} x \\ y \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 \\ 1 \end{pmatrix}$$

$$\begin{pmatrix} 0 & -1 \\ 1 & 0 \end{pmatrix} \cdot \begin{pmatrix} 1 \\ 1 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} -1 \\ 1 \end{pmatrix}$$

Kierunek wektora rotacji \mathbf{k} pokazuje orientację osi obrotu a jego długość odpowiada tangensowi połowy kąta obrotu χ . Wektory obrotu dodają się według następującej reguły: dwa kolejne obroty przeprowadzone w tym samym układzie odniesienia, opisane przez wektory obrotu \mathbf{k}_1 i \mathbf{k}_2 dają wypadkowy wektor obrotu \mathbf{k}_3 :

$$\vec{k}_3 = (1 - \vec{k}_1 \cdot \vec{k}_2)^{-1} (\vec{k}_1 + \vec{k}_2 + \vec{k}_1 \times \vec{k}_2)$$

gdzie "." i "x" oznaczają iloczyn skalarny i wektorowy wektorów.

Oznaczmy symbolem \mathbf{k}^0 wektor rotacji, który opisuje orientację w Laboratoryjnym Układzie Odniesienia (Laboratory Coordinate System, LCS) układu związanego z cząsteczką (Particle Coordinate System, PCS) w "chwili zero". Wtedy orientacja po kroku czasowym Δt będzie dana przez:

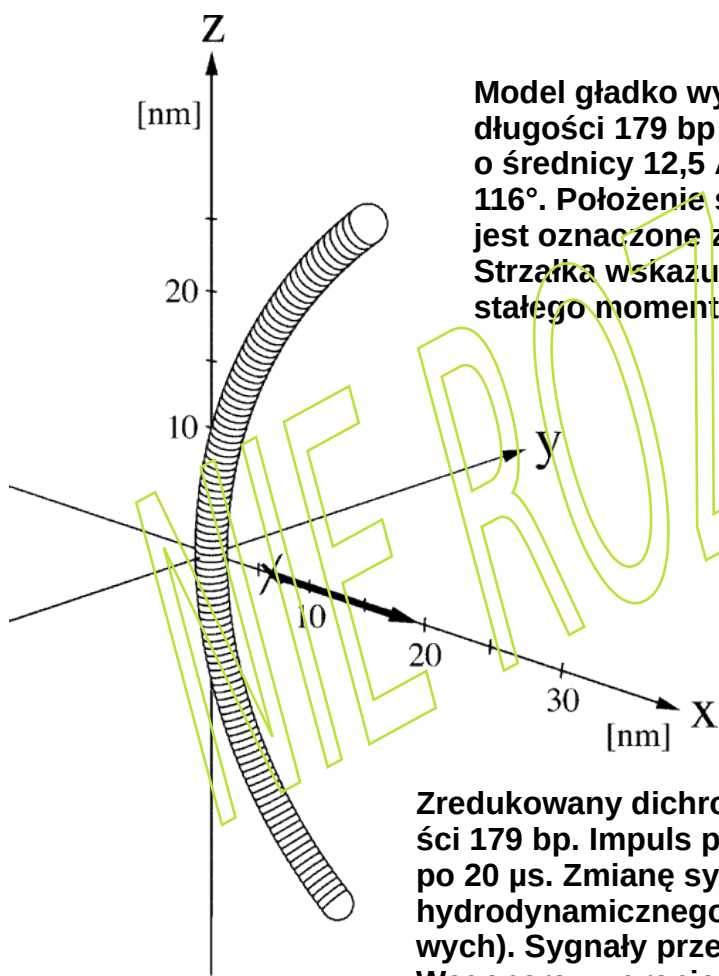
$$\vec{k} = \vec{k}^0 \oplus \frac{\hat{D}_r \vec{T}^0 \Delta t}{kT} + \vec{K}_{rnd}(\Delta t)$$

Gdzie indeks górny 0 oznacza stosowną wielkość na początku kroku czasowego Δt , D_r jest rensorem dyfuzji rotacyjnej, \mathbf{T}^0 jest wektorem momentu sił działającego na cząstkę, a $\mathbf{K}_{rnd}(\Delta t)$ jest przypadkowym krokiem obrotowym. Trzy niezależne składowe przypadkowego kroku obrotowego, dające wkład do $\mathbf{K}_{rnd}(\Delta t)$, są losowane z jednowymiarowego rozkładu Gaussa o średniej zero i odchyleniu standardowym wynoszącym $(2D_{r,ii}\Delta t)^{1/2}$ gdzie $i = x, y, z$. Dwa ostatnie wyrazy po prawej stronie powyższego równania dodają się jak zwykłe wektory gdyż odnoszą się do tej samej chwili czasu. Wektor otrzymany z tego dodawania ma kierunek osi obrotu i kąta obrotu. Transformuje się go do postaci wektora obrotu $\mathbf{k}(\Delta t)$ i dodaje do wektora obrotu \mathbf{k}^0 jak pokazano powyżej. Unikalny charakter tego ostatniego dodawania jest oddany przez użycie symbolu \oplus .

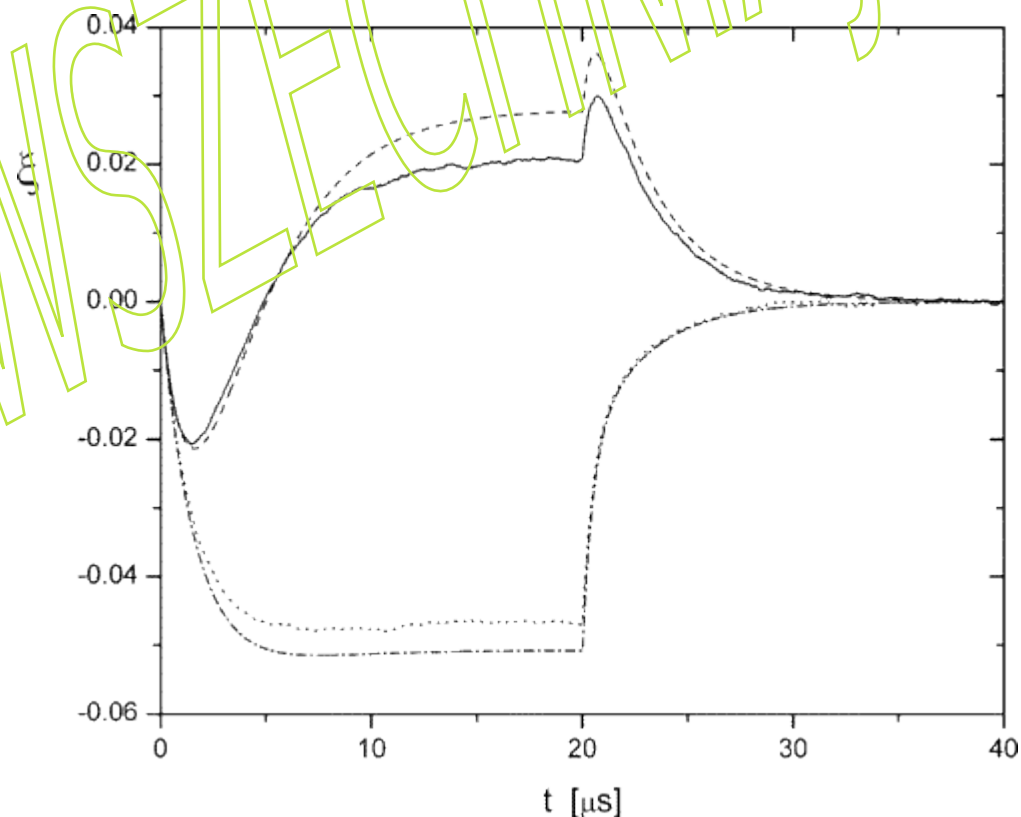
Aby uzyskać bardziej realistyczny opis ruchu obrotowego, należy dodać obroty wynikające ze sprzężenia hydrodynamicznego ruchów obrotowych i translacyjnych, poprzez odpowiedni dyfuzyjny tensor sprzężenia:

$$\vec{k} = \vec{k}^0 \oplus \frac{\hat{D}_r \vec{T}_{CD}^0 \Delta t}{kT} + \frac{q \hat{D}_{c,CD} \vec{E}^0 \Delta t}{kT} + \vec{K}_{rnd}(\Delta t)$$

Gdzie indeks dolny O wskazuje na zależność od położenia środka PCS. \vec{E}^0 jest wektorem pola elektrycznego w PCS na początku kroku czasowego Δt , i q jest ładunkiem elektrycznym netto cząsteczki. Teraz składowe przypadkowego kroku obrotowego $\vec{K}_{rnd}(\Delta t)$ nie są niezależne z powodu sprzężenia między ruchami obrotowymi i translacyjnymi. Musimy wygenerować uogólniony krok przypadkowy, który obejmuje trzy składowe obrotowe i trzy translacyjne używając pełnego tensora dyfuzji (6×6). Szczegóły podaje oryginalna referencja. ¹



Model gładko wygiętego DNA o długości 179 bp ze 101 kulkami o średnicy 12,5 Å. Kąt zgięcia 116°. Położenie środka dyfuzji jest oznaczone znakiem x. Strzałka wskazuje kierunek stałego momentu dipolowego.



Zredukowany dichroizm elektryczny ξ w funkcji czasu t obliczonego dla gładko wygiętego DNA o długości 179 bp. Impuls pola elektrycznego o wartości 5 kV/cm został przyłożony w czasie zero i zakończony po 20 μ s. Zmianę sygnału w czasie uzyskano metodą dynamiki Browna z uwzględnieniem sprzężenia hydrodynamicznego i bez niego (— i \cdots , odpowiednio; średnia z 1.1×10^6 individual sygnałów przejściowych). Sygnały przejściowe były także obliczone korzystając z równań wyprowadzonych przez Wegenera, w granicy małych pól E , z oraz bez sprzężenia hydrodynamicznego (- - - i - · - · - odpowiednio).