

## **Motores moleculares, moléculas únicas, y super-resolución.**

Marcelo Nollmann – propuesta de materia optativa 2018

Los motores moleculares son proteínas o complejos proteicos que convierten la energía química en movimiento. Sus actividades son esenciales dentro de la célula, por ejemplo para replicar, segregar, transcribir or reparar el ADN, o fuera de la célula, por ejemplo las kinesinas y dineínas responsables de la contracción muscular <sup>1-4</sup>. El trabajo realizado por los motores moleculares los hace particularmente sensibles a la acción de fuerzas externas. En las últimas dos décadas, una serie de métodos experimentales de manipulación de moléculas únicas- pinzas ópticas o magnéticas, o la microscopía de fuerza atómica, entre otras- han sido desarrollados para comprender la mecanoquímica de estos motores. Las primera parte del curso cubrirá las bases biológicas de los motores moleculares, técnicas de manipulación de molécula única, y ejemplos de la utilización de estas técnicas para comprender el mecanismo físico de funcionamiento de estos motores <sup>5-7</sup>.

Estas técnicas de manipulación no permiten, sin embargo, el estudio de motores moleculares *in vivo*. Para ello, una nueva clase de técnicas basadas en la detección de moléculas únicas en células se ha desarrollado en la última década. Estas técnicas permiten la caracterización de la dinámica de motores moleculares y de las estructuras que estos forman a la escala nanométrica <sup>8-11</sup>. La segunda parte del curso se dedicara a la introduccion de tecnicas de deteccion de molecula unica por fluorescencia, seguido de una descripción más detallada de las técnicas de microscopía de localización de molécula única. Esta segunda parte se terminará con una descripción de ejemplos de aplicación de estos métodos experimentales al estudio de motores moleculares, y la organización del ADN en la célula.

La tercera parte del curso será dedicada a un módulo experimental en donde se realizarán experiencias de detección de moléculas únicas por fluorescencia y se utilizarán microscopias de localización para la determinación de estructuras nanométricas en células y el seguido de trayectorias dinámicas de moléculas en células vivas (single-molecule tracking) <sup>4,12-17</sup>.

## Propuesta de contenido

1. Biofísica de Motores Moleculares. Principios básicos de la mecanoquímica. La polimerasa de RNA, replisoma, translocasas y helicasas, condensinas [6h].
2. Técnicas de manipulación de moléculas únicas: pinzas ópticas, magnéticas, AFM. Modulación del ciclo mecanoquímico con fuerza. Aplicaciones de técnicas de manipulación al estudio de motores moleculares [8h].
3. Técnicas de detección de moléculas únicas: Principios básicos de microscopias (confocal, widefield, etc), origen del límite de resolución en un sistema óptico. Técnicas de microscopias de super-resolution. Introducción a la detección de moléculas únicas por fluorescencia (SHREC, FIONA, PALM, STORM, DNA-PAINT, etc) [4h].
4. Detección de moléculas únicas en 3D. Astigmatismo, doble hélice, ingeniería de la PSF, microscopia multi-focal [6h].
5. Cálculo de la resolución en super-resolución. Single-particle tracking. Aplicaciones [4h].
6. Aplicaciones de técnicas de microscopía de molécula única al estudio de motores moleculares *in vivo* [6h].
7. Modulo experimental [8h].

## Referencias

1. Cozzarelli, N. R., Cost, G. J., Nollmann, M., Viard, T. & Stray, J. E. Giant proteins that move DNA: bullies of the genomic playground. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 580–588 (2006).
2. Nakamura, M., Chen, L., Howes, S. C., Schindler, T. D., Nogales, E. & Bryant, Z. Remote control of myosin and kinesin motors using light-activated gearshifting. *Nat. Nanotechnol.* **9**, 693–697 (2014).
3. Faure, L. M., Fiche, J.-B., Espinosa, L., Ducret, A., Anantharaman, V., Luciano, J., Lhospice, S., Islam, S. T., Tréguier, J., Sotes, M., Kuru, E., Van Nieuwenhze, M. S., Brun, Y. V., Théodoly, O., L. A., Nollmann, M. & Mignot, T. The mechanism of force transmission at bacterial focal adhesion complexes. *Nature* (2016). doi:10.1038/nature20121
4. Leake, M. C., Chandler, J. H., Wadhams, G. H., Bai, F., Berry, R. M. & Armitage, J. P.

- Stoichiometry and turnover in single, functioning membrane protein complexes. *Nature* **443**, 355–358 (2006).
5. Gore, J., Bryant, Z., Stone, M. D., Nollmann, M., Cozzarelli, N. R. & Bustamante, C. Mechanochemical analysis of DNA gyrase using rotor bead tracking. *Nature* **439**, 100–104 (2006).
  6. Nollmann, M., Stone, M. D., Bryant, Z., Gore, J., Crisona, N. J., Hong, S. C., Mittelheiser, S., Maxwell, A., Bustamante, C. & Cozzarelli, N. R. Multiple modes of Escherichia coli DNA gyrase activity revealed by force and torque. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **14**, 264–271 (2007).
  7. Chistol, G., Liu, S., Hetherington, C. L., Moffitt, J. R., Grimes, S., Jardine, P. J. & Bustamante, C. High degree of coordination and division of labor among subunits in a homomeric ring ATPase. *Cell* **151**, 1017–1028 (2012).
  8. Churchman, L. S. & Spudich, J. A. Single-molecule high-resolution colocalization of single probes. *Cold Spring Harb. Protoc.* **2012**, 242–245 (2012).
  9. Reck-Peterson, S. L., Yildiz, A., Carter, A. P., Gennerich, A., Zhang, N. & Vale, R. D. Single-molecule analysis of Dynein processivity and stepping behavior. *Cell* **126**, 335–348 (2006).
  10. Shroff, H., Galbraith, C. G., Galbraith, J. A., White, H., Gillette, J., Olenych, S., Davidson, M. W. & Betzig, E. Dual-color superresolution imaging of genetically expressed probes within individual adhesion complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 20308–20313 (2007).
  11. Betzig, E., Patterson, G. H., Sougrat, R., Lindwasser, O. W., Olenych, S., Bonifacino, J. S., Davidson, M. W., Lippincott-Schwartz, J. & Hess, H. F. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science* **313**, 1642–1645 (2006).
  12. Salas, D., Le Gall, A., Fiche, J.-B., Valeri, A., Ke, Y., Bron, P., Bellot, G. & Nollmann, M. Angular reconstitution-based 3D reconstructions of nanomolecular structures from superresolution light-microscopy images. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2017). doi:10.1073/pnas.1704908114
  13. Le Gall, A., Cattoni, D. I., Guilhas, B., Mathieu-Demazière, C., Oudjedi, L., Fiche, J.-B., Rech, J., Abrahamsson, S., Murray, H., Bouet, J.-Y. & Nollmann, M. Bacterial partition complexes segregate within the volume of the nucleoid. *Nat. Commun.* **7**, 12107 (2016).
  14. Hammar, P., Leroy, P., Mahmutovic, A., Marklund, E. G., Berg, O. G. & Elf, J. The lac repressor displays facilitated diffusion in living cells. *Science* **336**, 1595–1598 (2012).
  15. Stracy, M., Lesterlin, C., Garza de Leon, F., Uphoff, S., Zawadzki, P. & Kapanidis, A. N.

Live-cell superresolution microscopy reveals the organization of RNA polymerase in the bacterial nucleoid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, E4390–9 (2015).

16. Cisse, I. I., Izeddin, I., Causse, S. Z., Boudarene, L., Senecal, A., Muresan, L., Dugast-Darzacq, C., Hajj, B., Dahan, M. & Darzacq, X. Real-time dynamics of RNA polymerase II clustering in live human cells. *Science* **341**, 664–667 (2013).
17. Badrinarayanan, A., Reyes-Lamothe, R., Uphoff, S., Leake, M. C. & Sherratt, D. J. In vivo architecture and action of bacterial structural maintenance of chromosome proteins. *Science* **338**, 528–531 (2012).