

---

# TÉCNICAS DE MOLÉCULA INDIVIDUAL APLICADAS AL ESTUDIO DE PROTEÍNAS

---

¿Por qué estudiar el comportamiento de moléculas individuales?

---

Analizamos las **ruta marítimas** entre Nueva York y San Francisco



# Promedios frente a trayectorias individuales

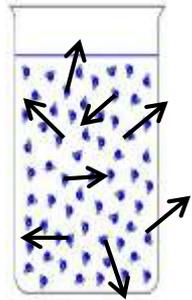
Al medir **propiedades promedio** perdemos información



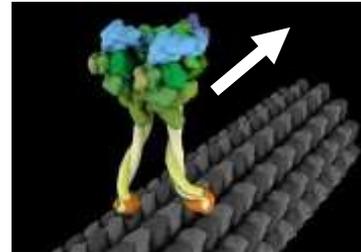
Ejemplo escuchado a **Steve Block**,  
uno de los pioneros de las pinzas ópticas

# Interés del estudio de moléculas individuales

- Obtención de **propiedades individuales** frente a **propiedades promedio**
- Estudio de **propiedades vectoriales**: desplazamiento, fuerza, etc...

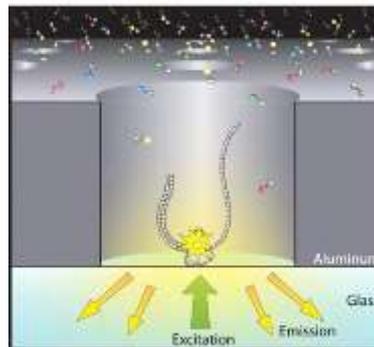


En un tubo de ensayo  
la **orientación  
molecular es aleatoria**



**Motores moleculares**

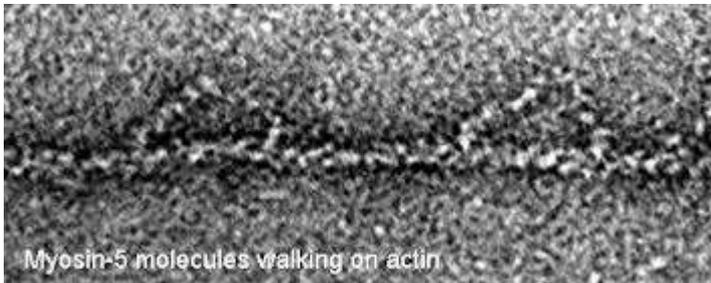
- **Paralelización** : secuenciación de ADN de última generación



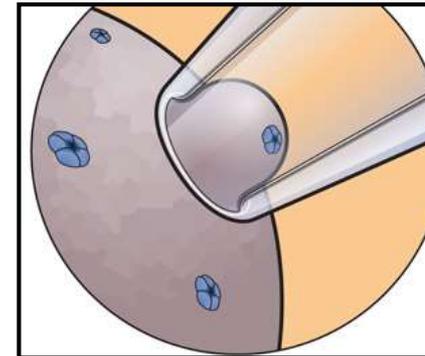
# Los primeros experimentos de molécula individual

## Técnicas de molécula individual

- **Observación** de moléculas individuales
- **Manipulación** de moléculas individuales



**Microscopio electrónico**  
E. Ruska  
Premio Nobel de Física, 1986



**Patch clamp** (electrofisiología)  
E. Neher y B. Sakmann  
Premio Nobel de Fisiología o Medicina, 1991

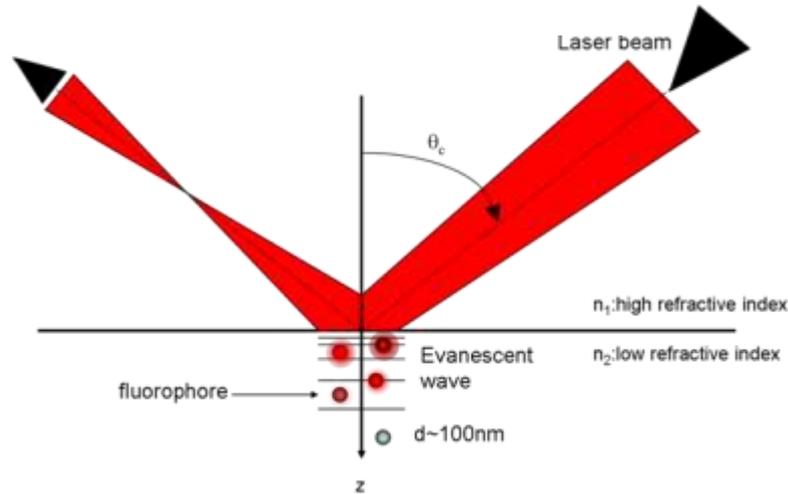
---

**Fluorescencia** de molécula individual  
aplicada al estudio de proteínas

---

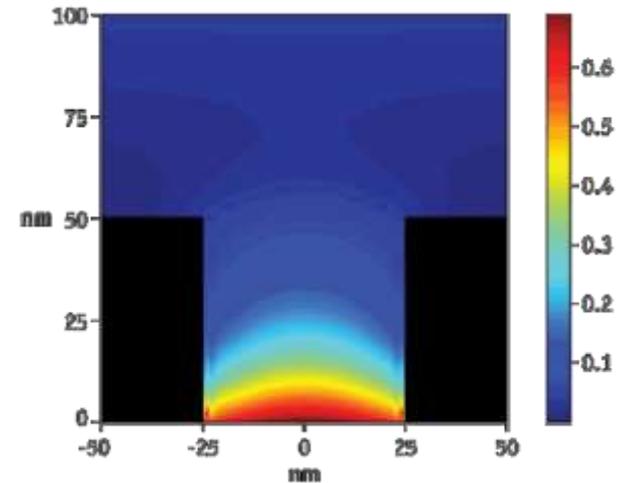
# Observación mediante fluorescencia de molécula individual

- Reducción de señal de fondo: **confinamiento** del volumen de excitación



**TIRF**

(Fluorescencia de reflexión interna total)



**Zero-mode waveguides**

- Optimización de **fluoróforos**



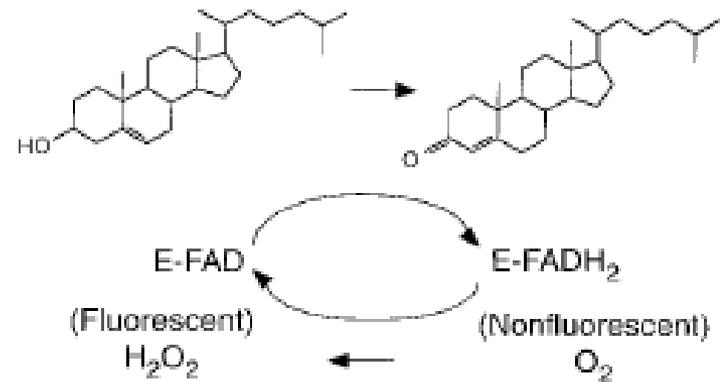
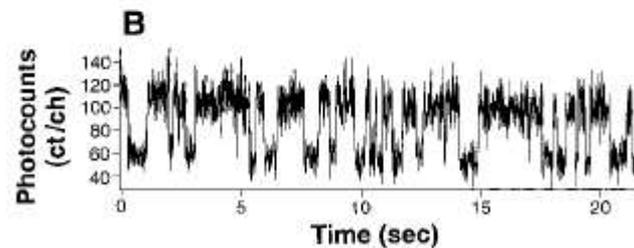
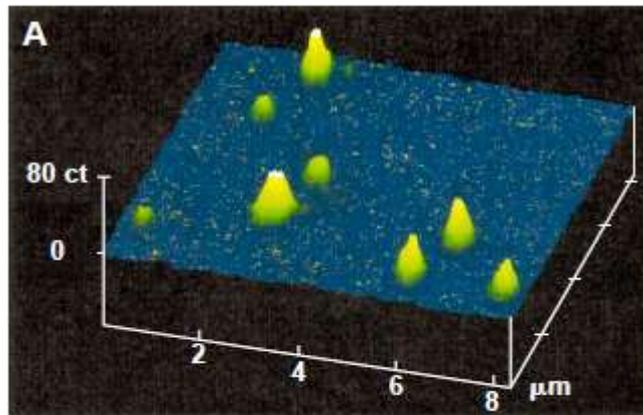
Conjugación química

- Mejores cámaras**



Proteínas fluorescentes

# Catálisis de una **enzima individual**: colesterol oxidasa



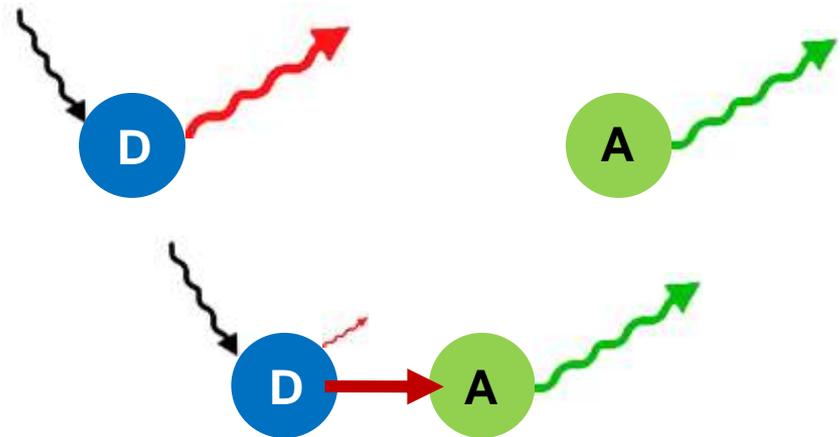
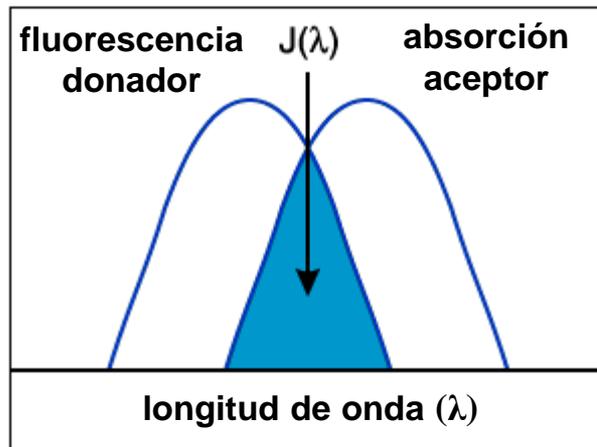
Las **enzimas fluctúan** entre estados de alta y baja actividad

# Transferencia de energía por resonancia Förster (FRET)

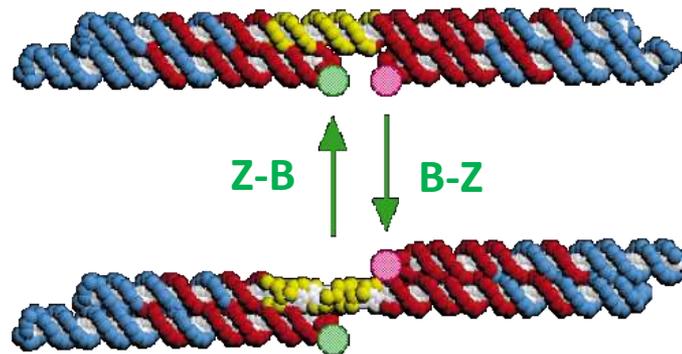
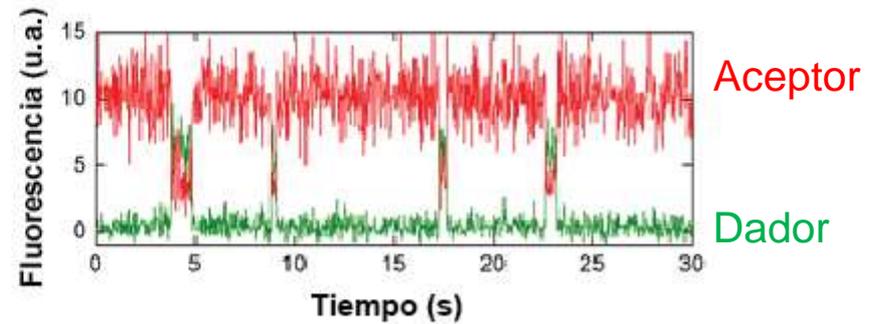
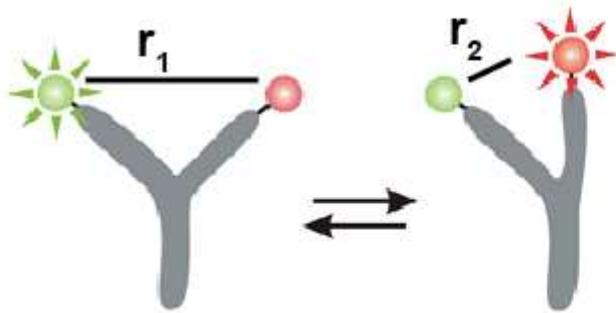
## Eficiencia FRET

$$E = \frac{1}{1 + (r/R_0)^6}$$

$R_0 = f$  (solapamiento espectral, orientación)



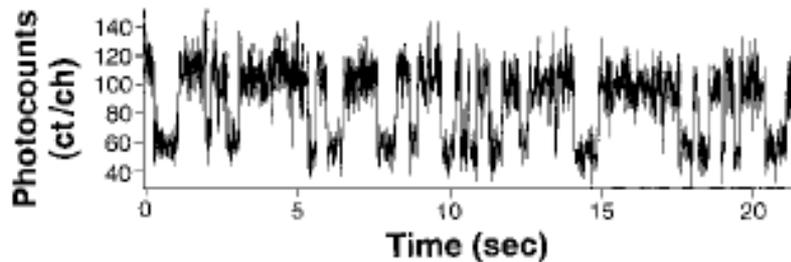
# Medida de cambios conformacionales mediante FRET



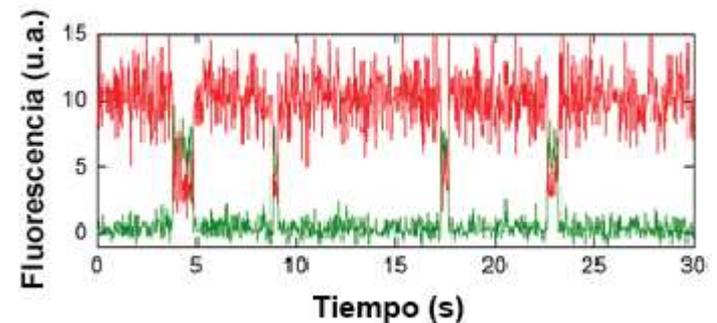
# Huella dactilar (*fingerprint*) en experimentos de molécula individual

Dos obligaciones del investigador:

- **Evaluar críticamente** sus resultados
- **Evaluar críticamente** los resultados de sus colegas



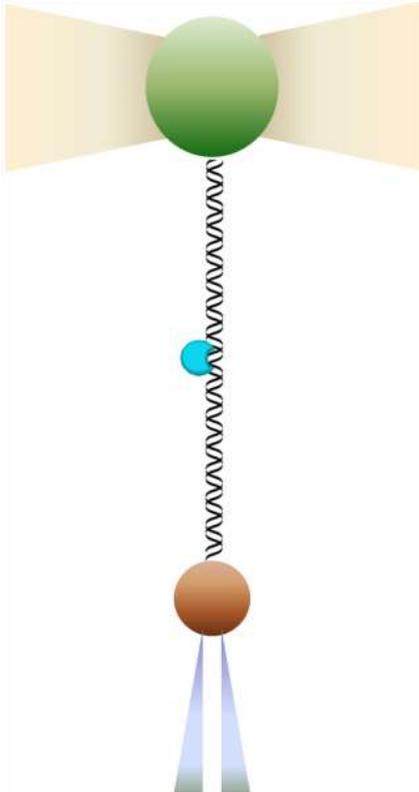
Colesterol oxidasa



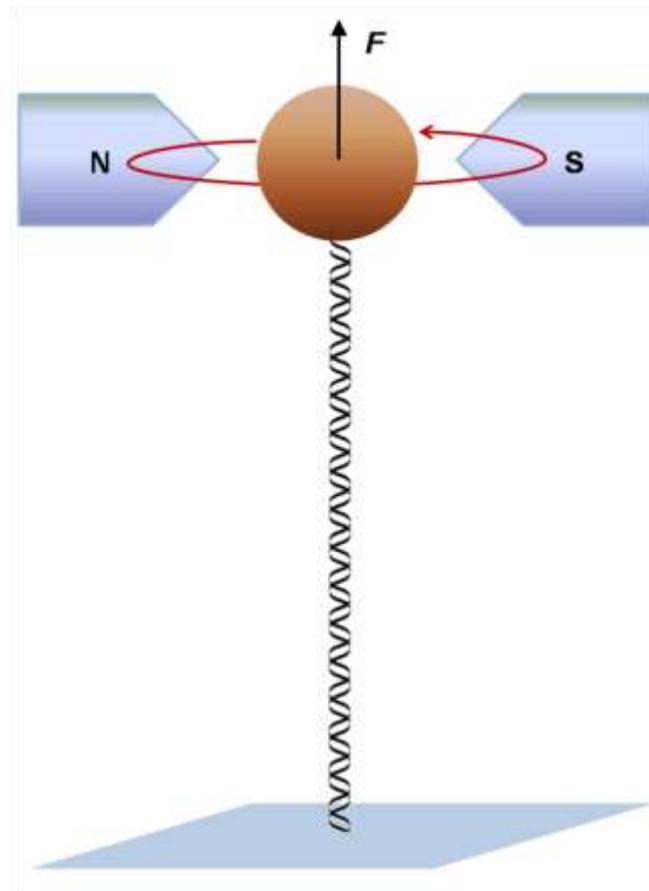
Cambio conformacional  
(FRET)

# Técnicas de **manipulación** de moléculas individuales

## Pinzas Ópticas



## Pinzas Magnéticas



## Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)



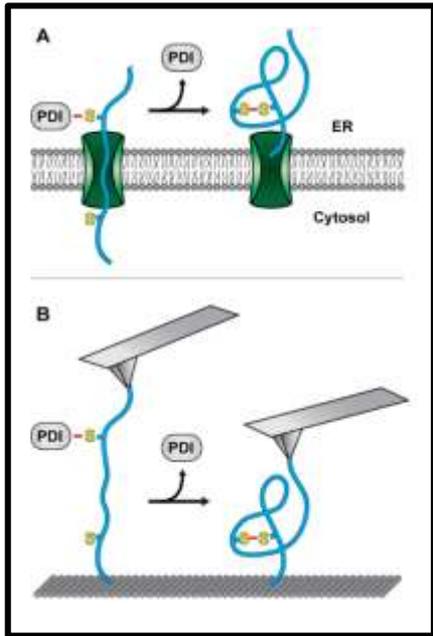
---

# AFM

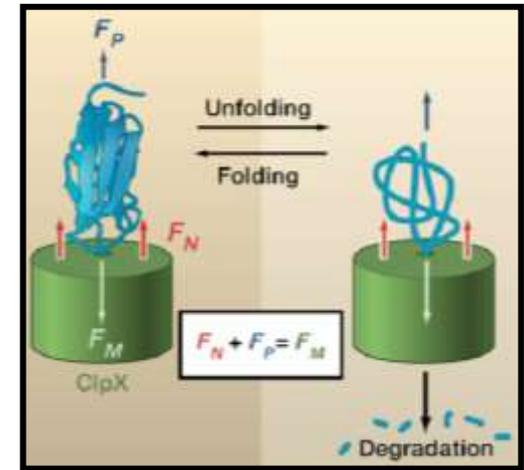
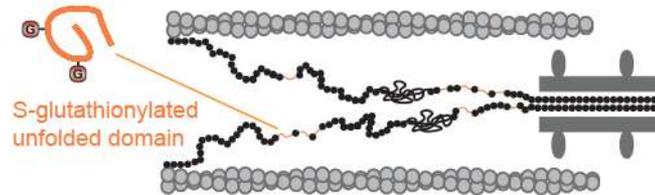
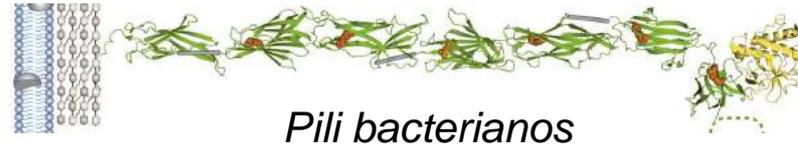
Microscopía de fuerza atómica  
aplicada al estudio de proteínas

---

# Fuerzas mecánicas y proteínas: desde el nacimiento a la muerte

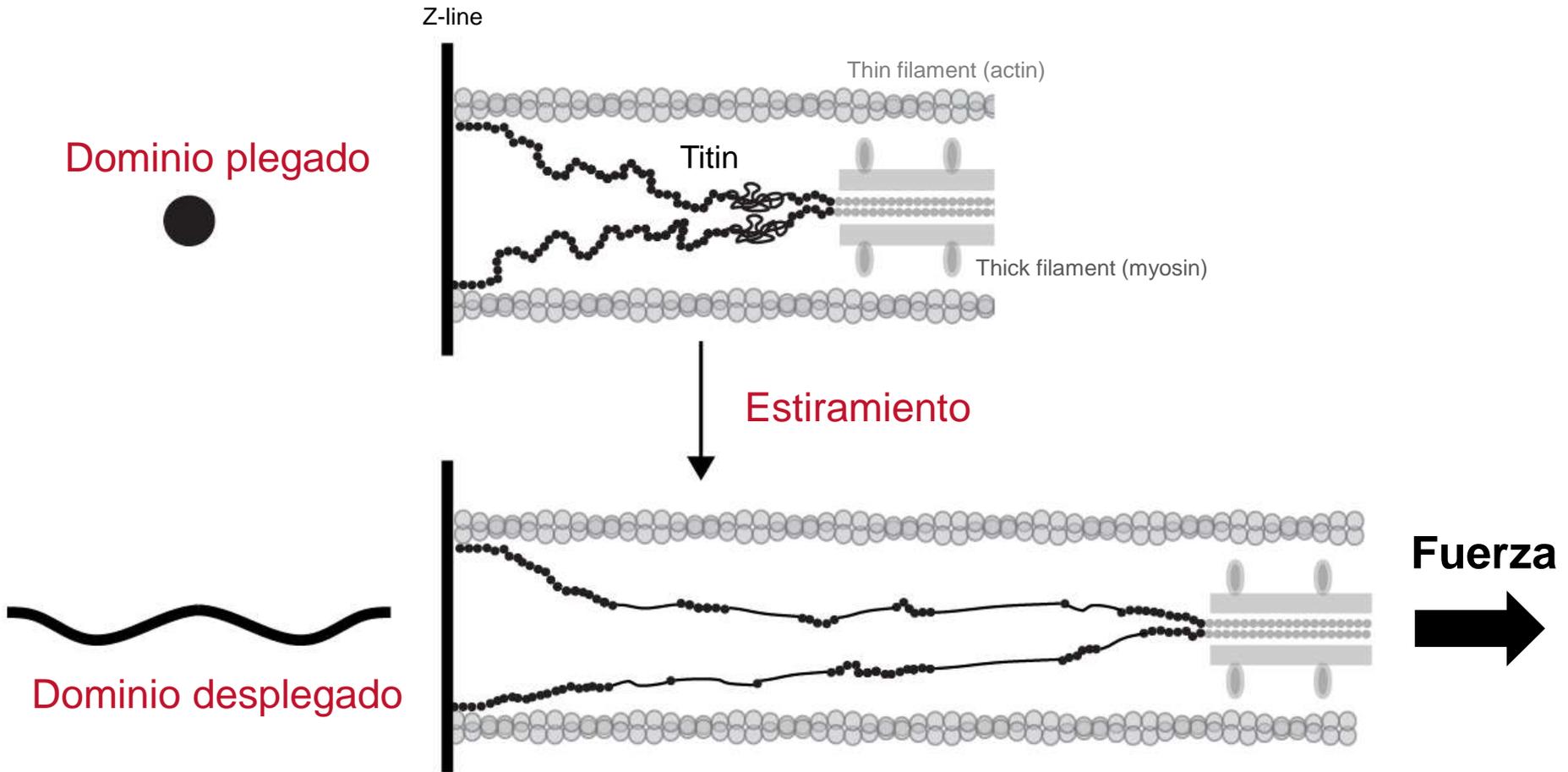


Síntesis de proteínas  
Plegamiento oxidativo

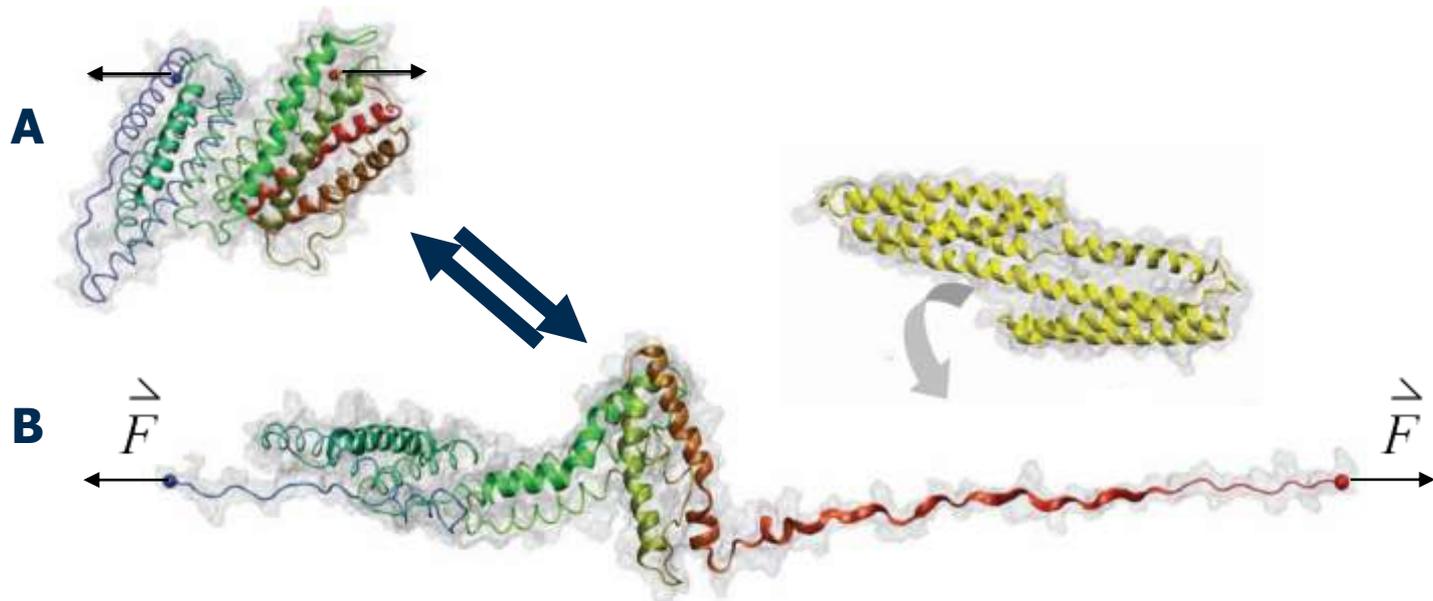


Degradación en  
proteosoma

# La elasticidad de las proteínas y el desplegamiento mecánico

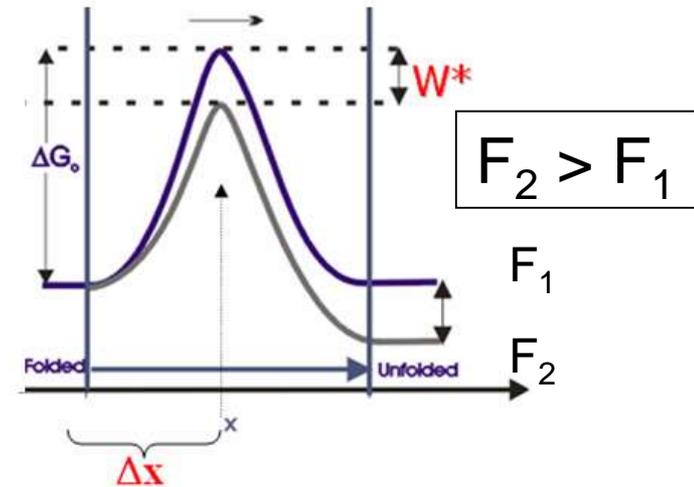
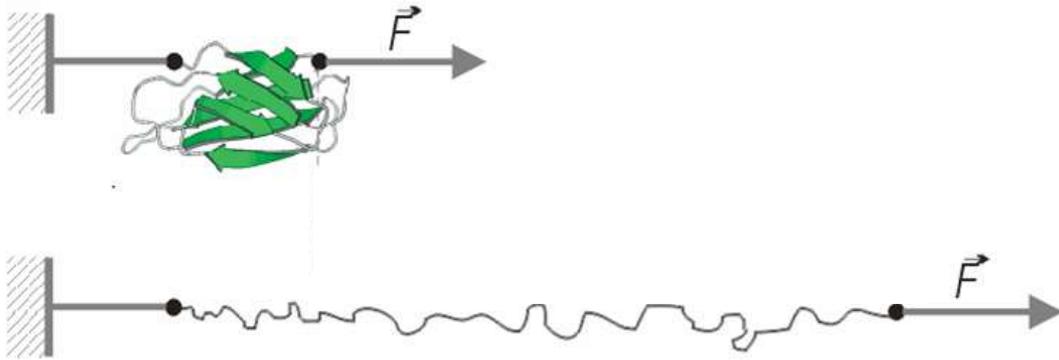


# Fuerzas mecánicas y exposición de **sitios crípticos**



Detección de señales mecánicas: **mecanotransducción**

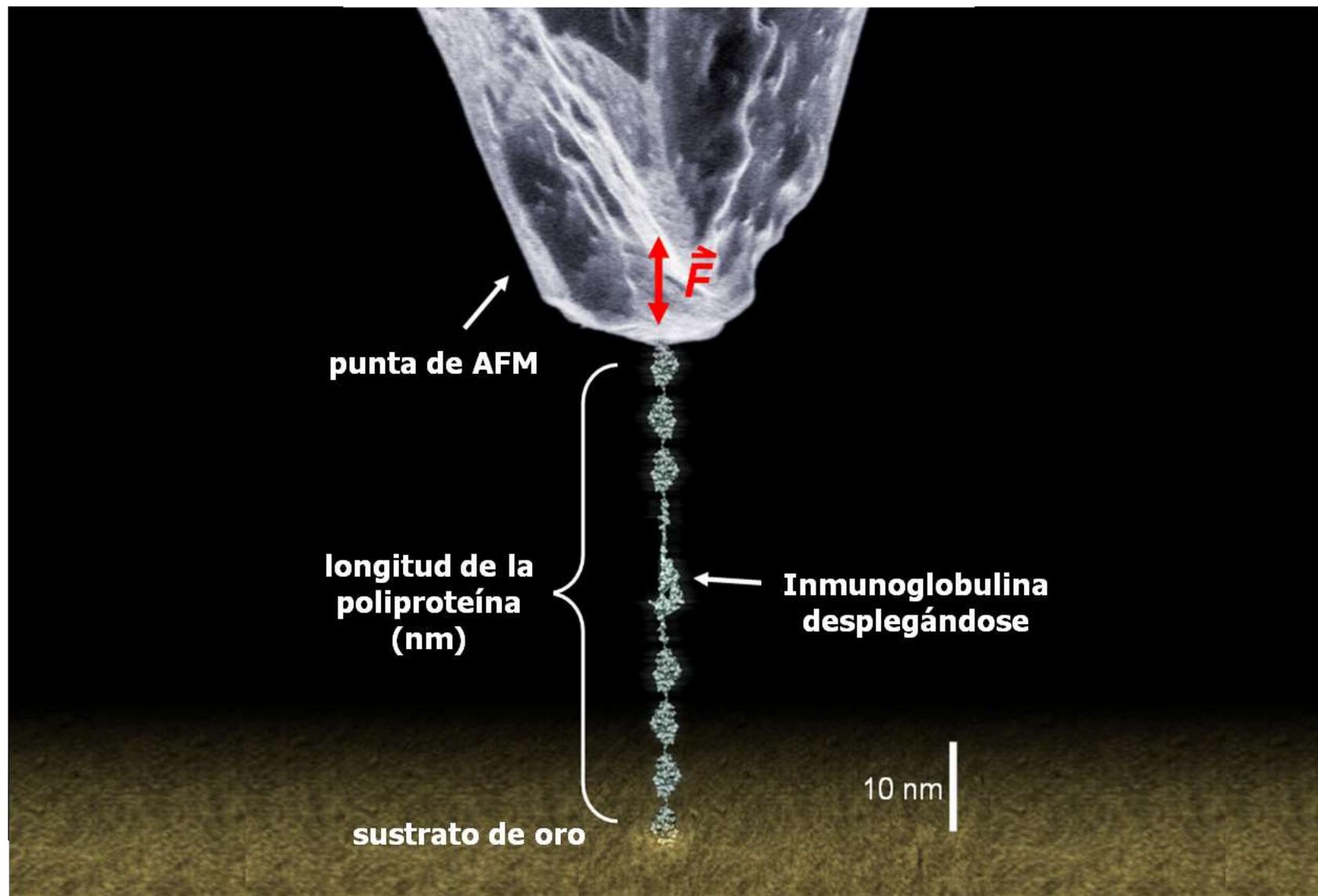
# Fuerzas mecánicas como desnaturalizantes de proteínas



Coordinada de reacción,  $x$   
(longitud de extremo a extremo)

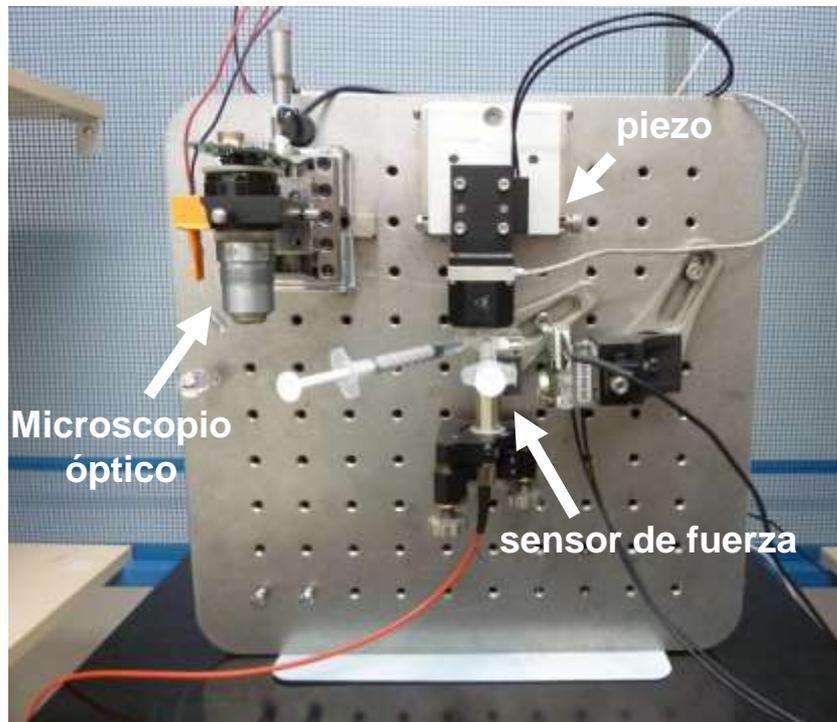
$$k_u = k_u^0 e^{F\Delta x / kT}$$

# El AFM como aplicador de fuerzas

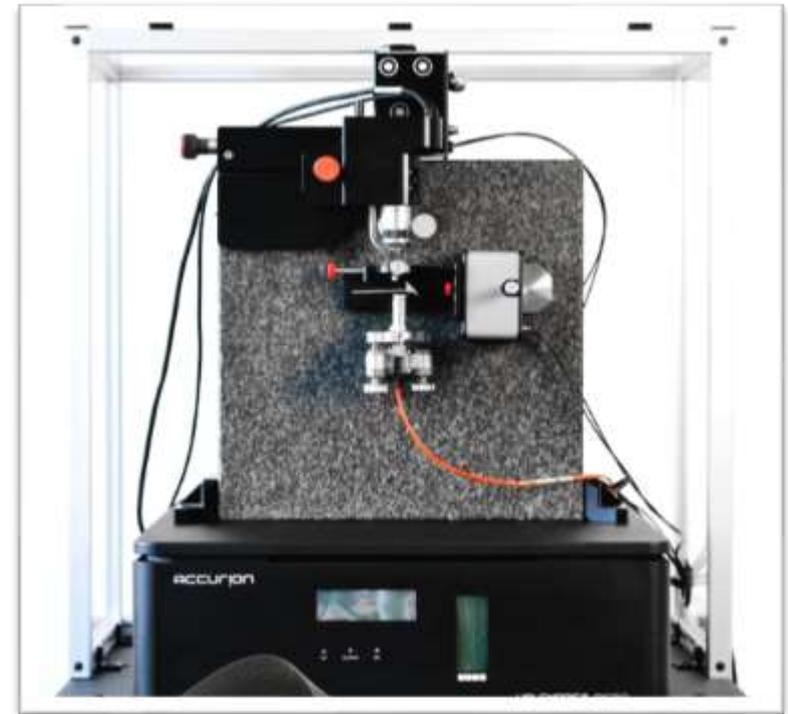


# Espectrómetros de AFM

**AFM casero**

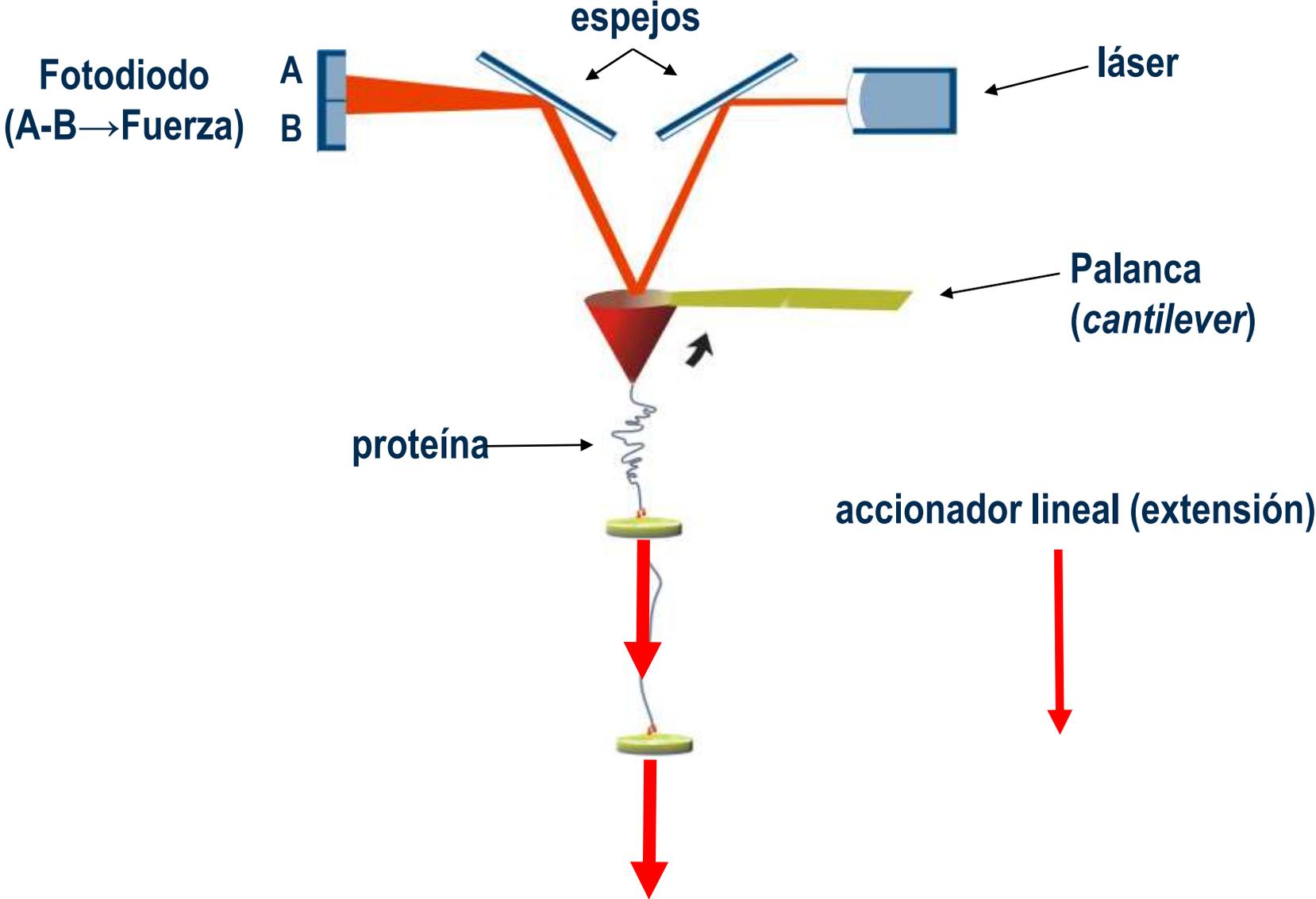


**AFM comercial (100K Euro)**



Muchos AFM comerciales están optimizados para imagen

# Experimentos a velocidad constante: *force-extension*



# Cantilevers de AFM para experimentos de molécula individual

**Bruker's Silicon Nitride Probe Cantilever Layouts**

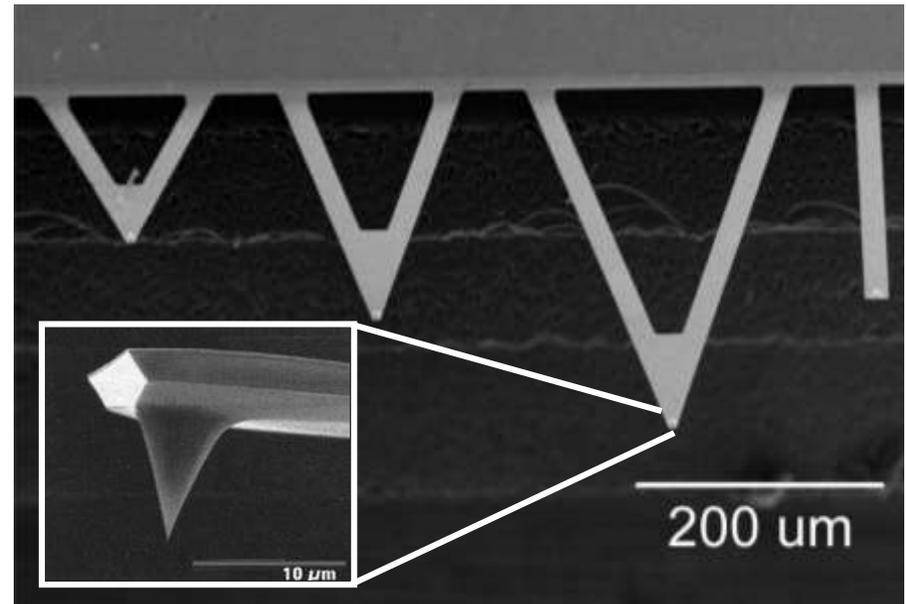
The cantilever orientation of Bruker's Silicon Nitride probe 10-packs is indicated below, with "top" indicating upward in the box, and "bottom" indicating downward in the box.

**BRUKER** Tel: 805-715-8440 Fax: 805-656-8310  
www.bruker.com  
#10probeorders@bruker.com

1	2	3	4	5
6	7	8	9	10

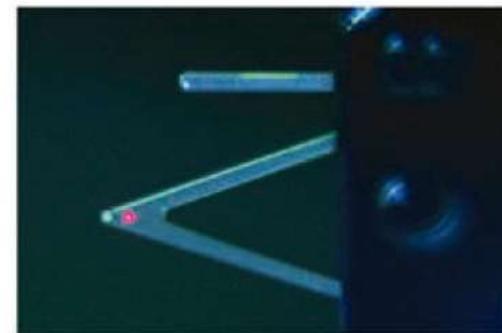
3601 Calle Torrey Pines C, Camarillo, CA 93012

One Cantilever	Four Cantilevers	Six Cantilevers
<ul style="list-style-type: none"><li>A on top</li><li>Products: ScanAsyst-Air, ScanAsyst-Fluid, ScanAsyst-Fluid+</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>A &amp; B on top</li><li>C &amp; D on bottom</li><li>Products: SNL, DNP, DNPS, NP, NPS, NP-Q, NPG, NPUC</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>A on top</li><li>B, C, D, E, F on bottom</li><li>Products: MSNL, MLCT, MSCT, MLCTO, MLCTUC, MSCTUC</li></ul>



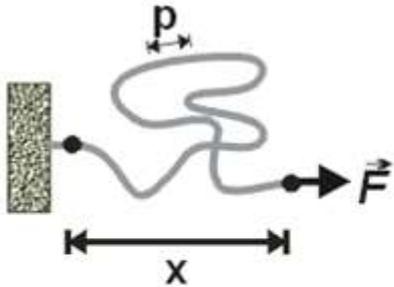
Escoger el cantilever adecuado: la **constante de muelle** (*spring constant*)

5-20 pN/nm



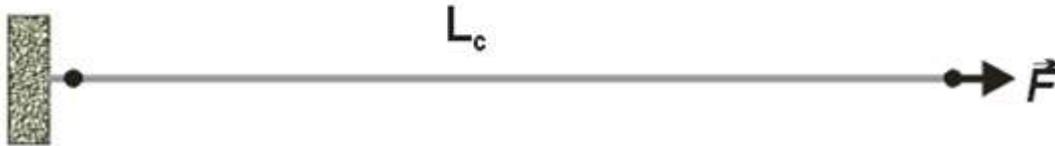
Enfoque del láser

# El modelo **worm-like chain** de elasticidad entrópica

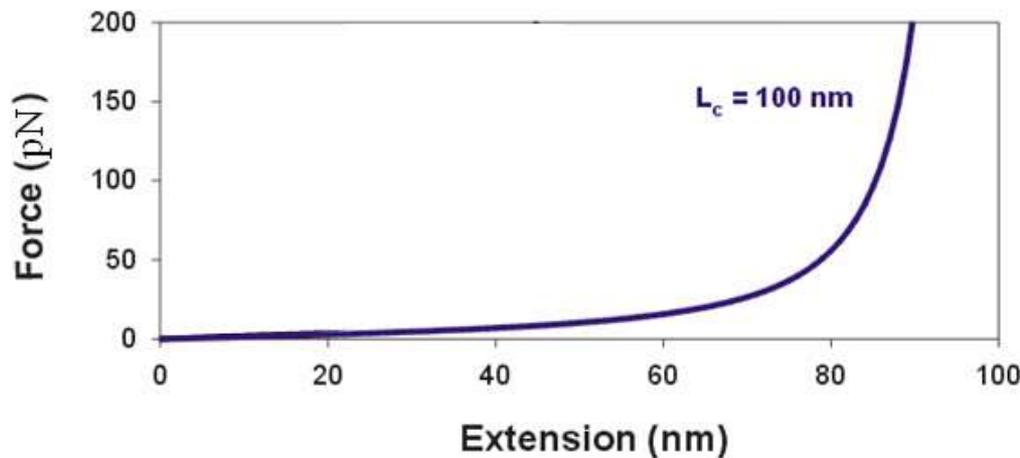


$$F(x) = \frac{kT}{p} \left[ \frac{1}{4} \left( 1 - \frac{x}{L_c} \right)^{-2} - \frac{1}{4} + \frac{x}{L_c} \right]$$

- $x$  : **extensión** de la molécula
- $L_c$ : **longitud de contorno**  
(extensión a fuerza infinita)
- $p$ : **longitud de persistencia**  
(~flexibilidad interna)

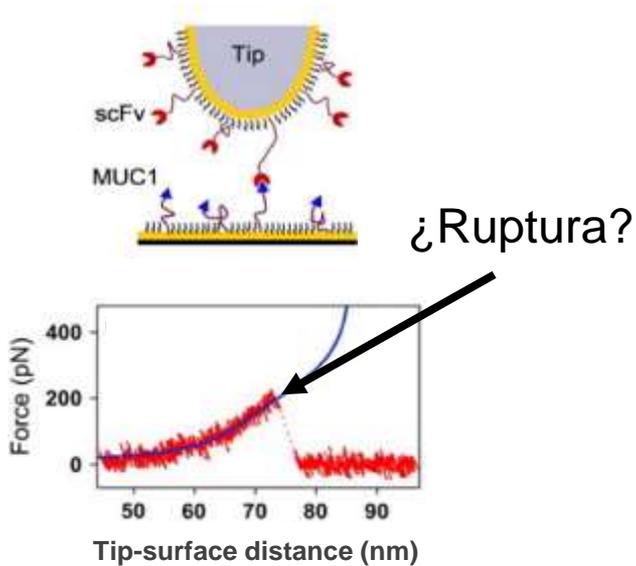


$p$  (ssDNA)  $\ll$   $p$  (dsDNA)



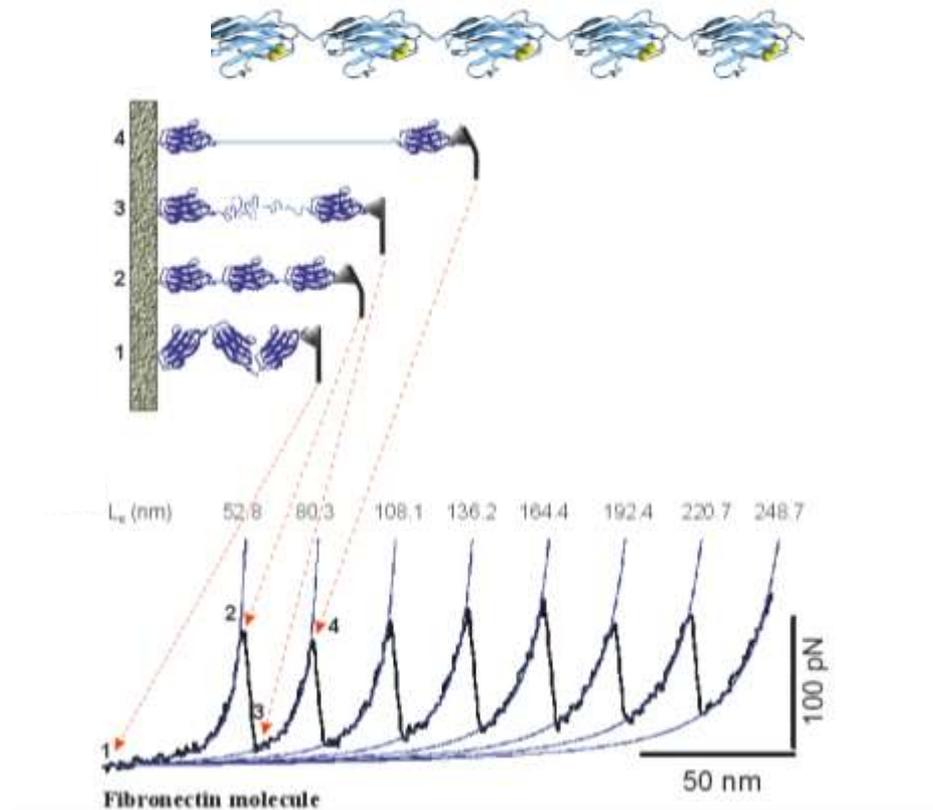
# La importancia del *fingerprint* en AFM

## Ruptura de enlace



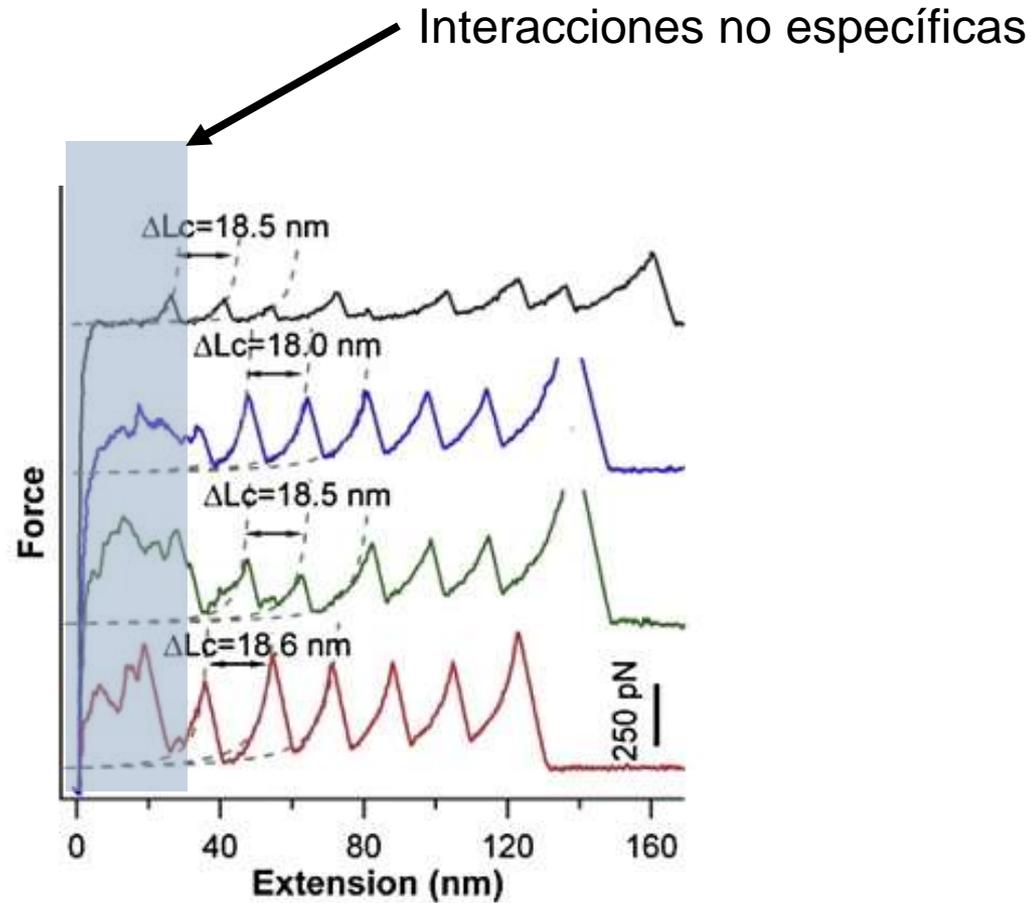
Distancia

## Desplegamiento de poliproteínas

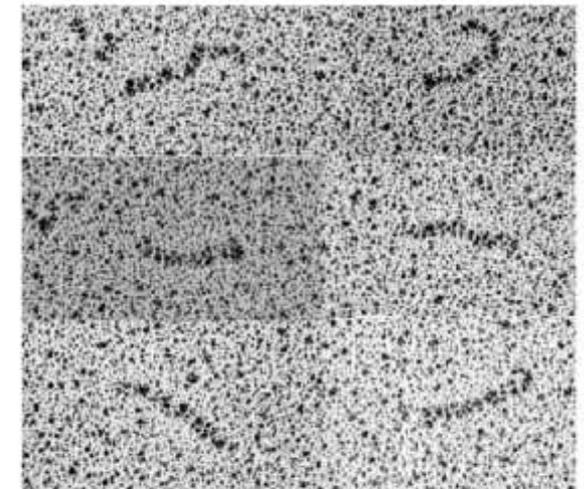
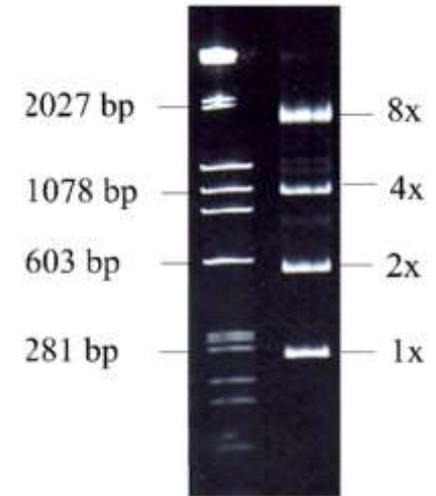
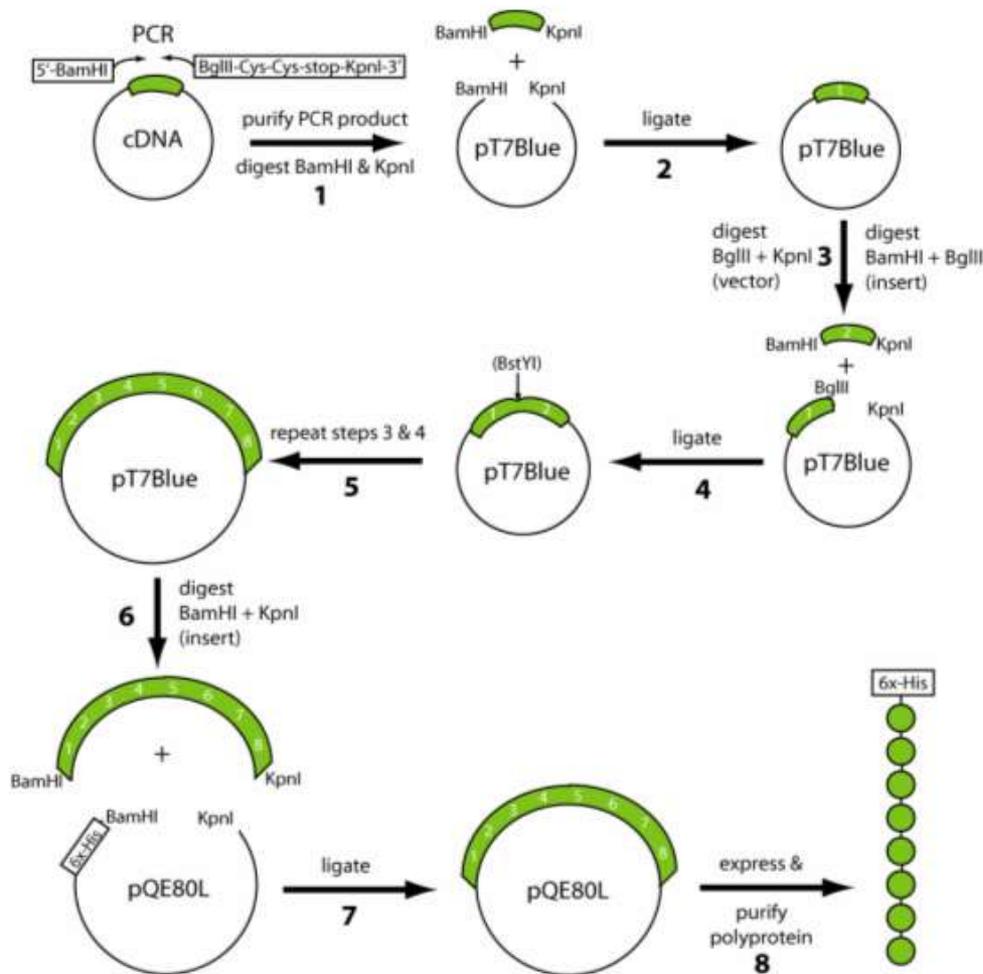


Patrón repetitivo (*sawtooth*)

# Interacciones no específicas ocurren cerca de la superficie



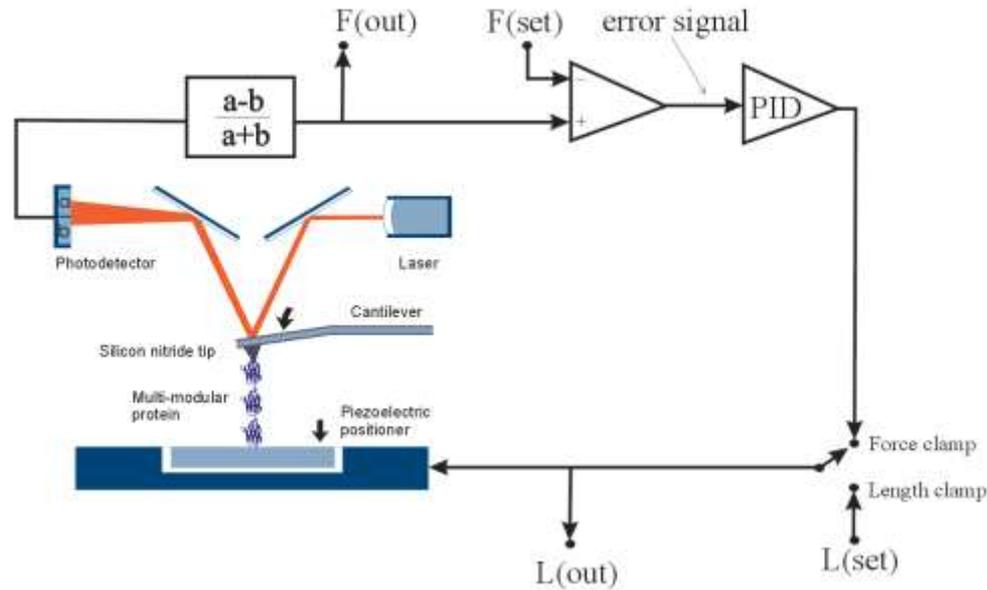
# Ingeniería de poliproteínas



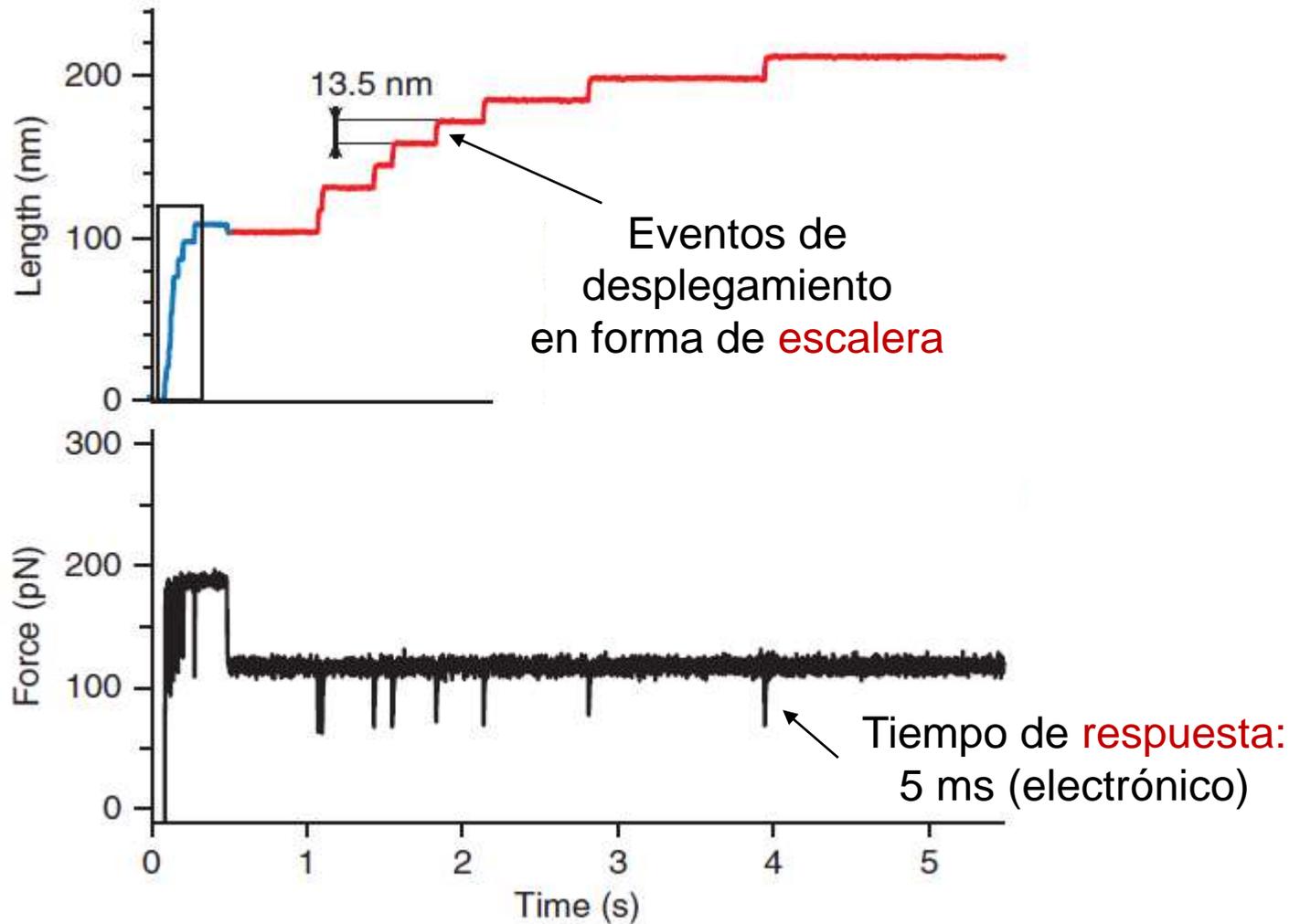
50 nm

# Experimentos a fuerza constante: *force-clamp*

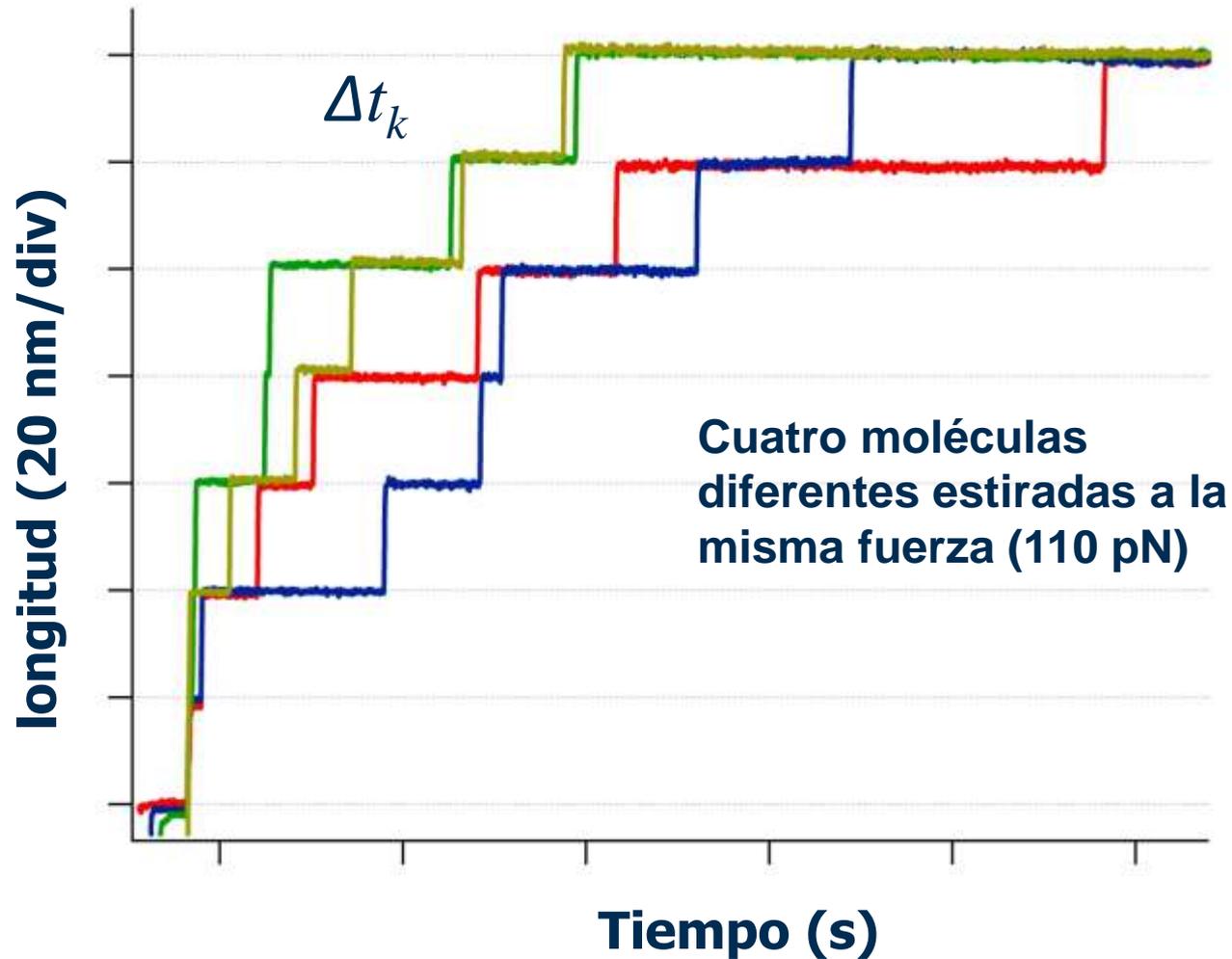
- ¿Cómo medimos **dependencias con la fuerza**?
- El uso de **sistemas de retroalimentación** permite mantener la fuerza constante



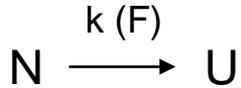
# Un ejemplo de un registro experimental **a fuerza constante**



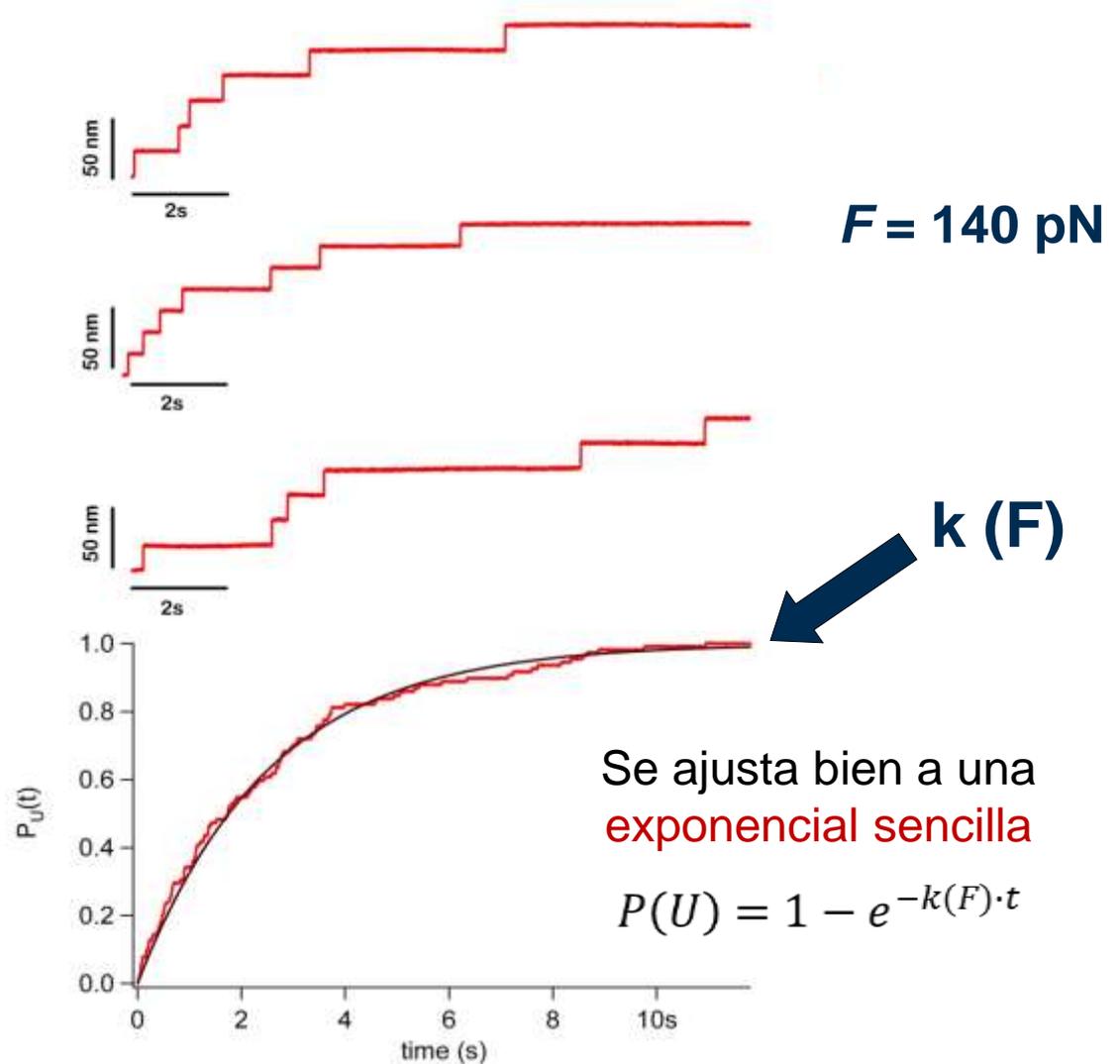
# Naturaleza **probabilística** de los eventos de desplegamiento



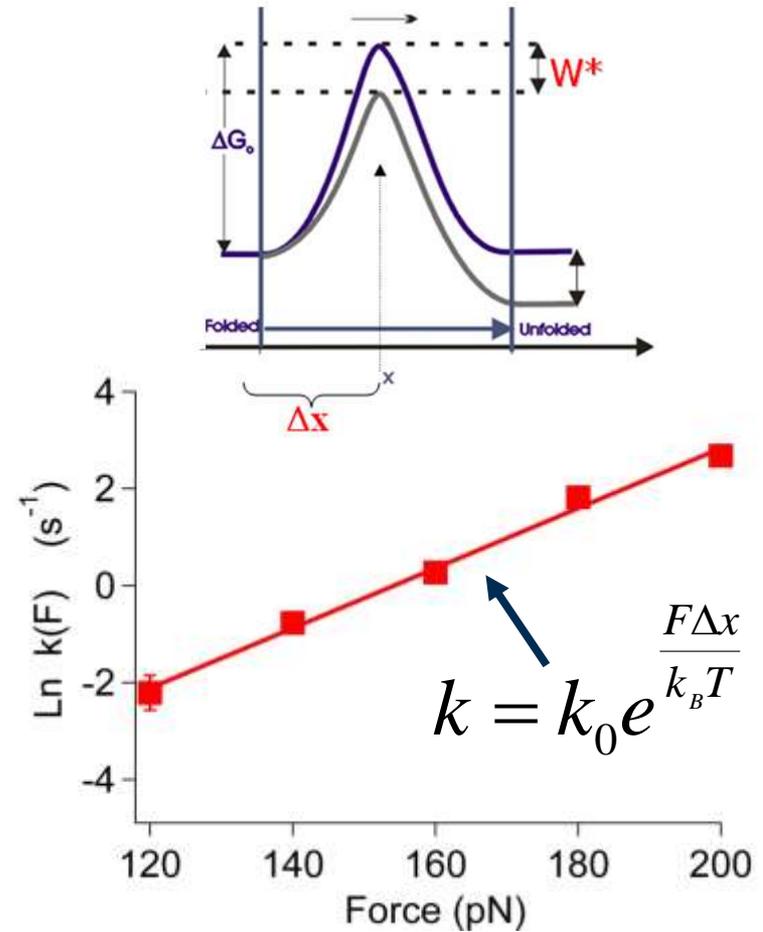
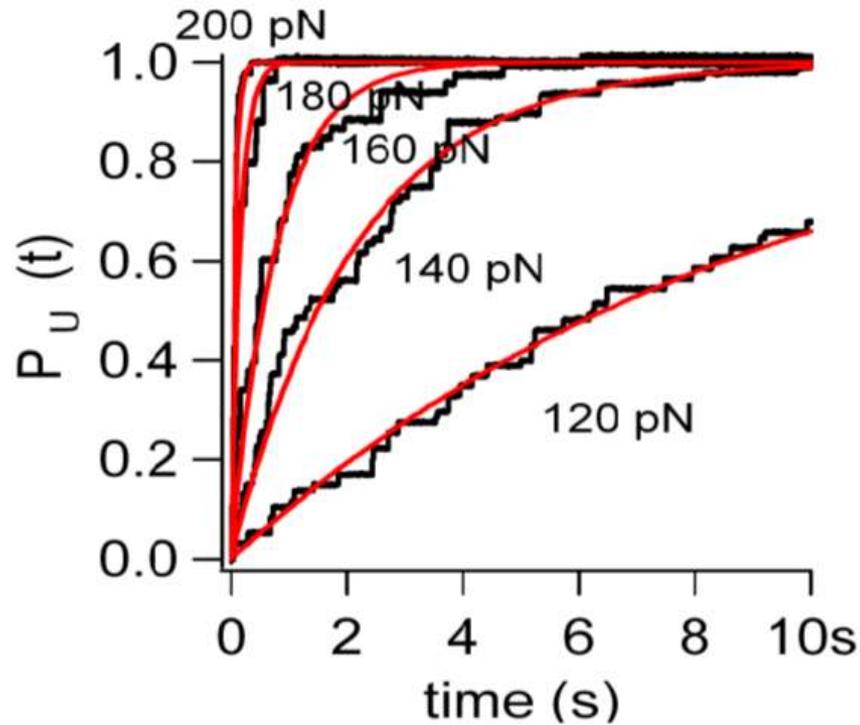
# Medida de la cinética de desplegamiento



Suma de varias trazas individuales

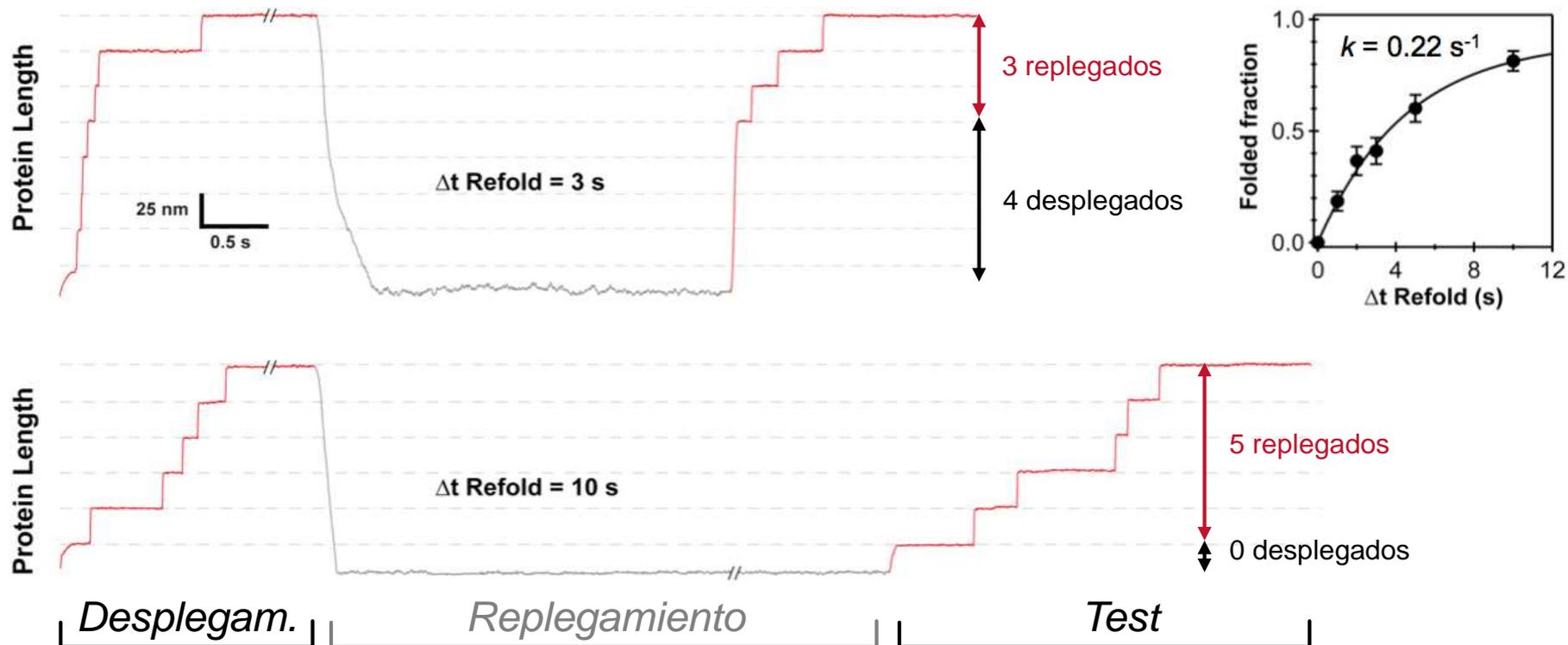


# Caracterización del desplegamiento mecánico

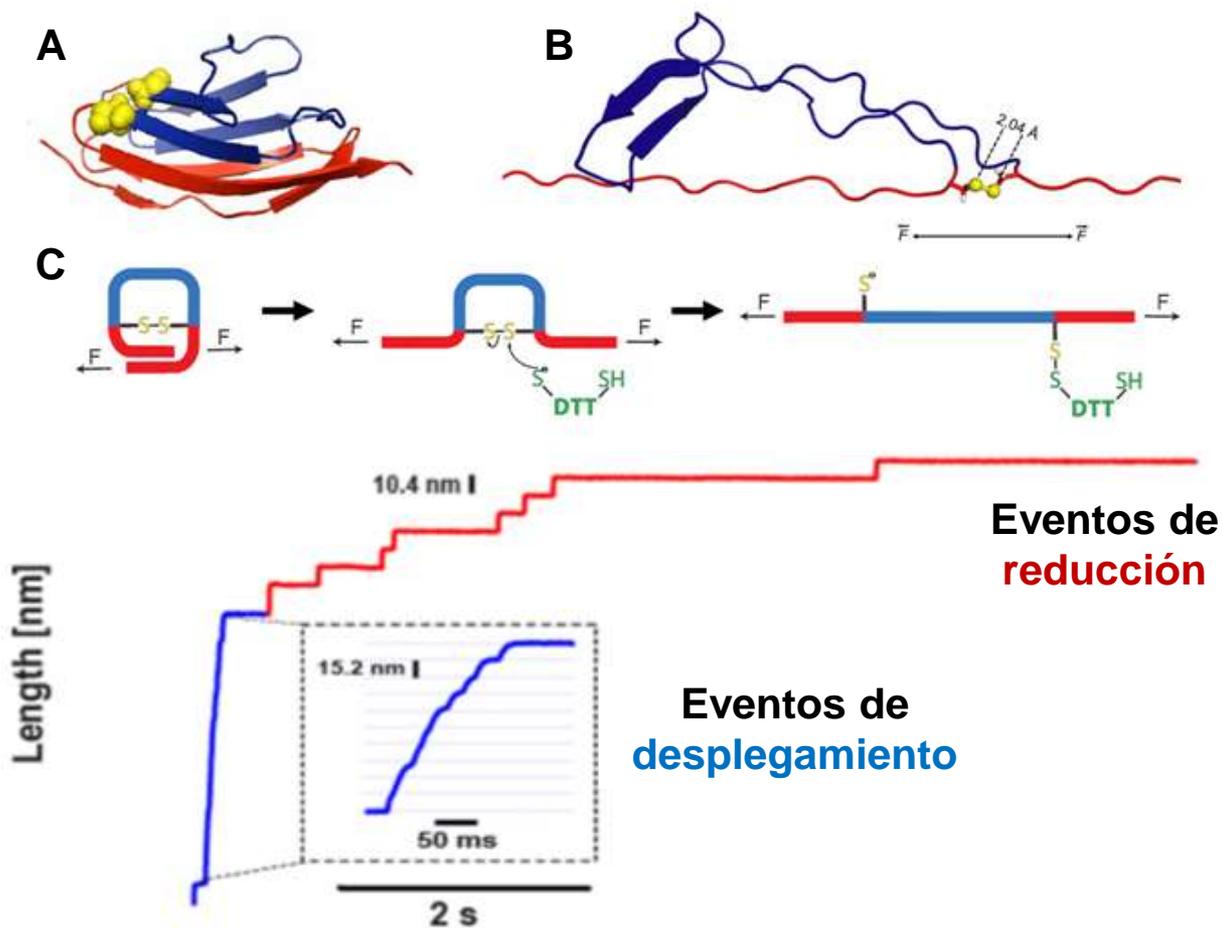


$$\Delta x_u = 2.4 \text{ \AA}$$

# Estudios de replegamiento



# Estudio de reacciones químicas a nivel individual



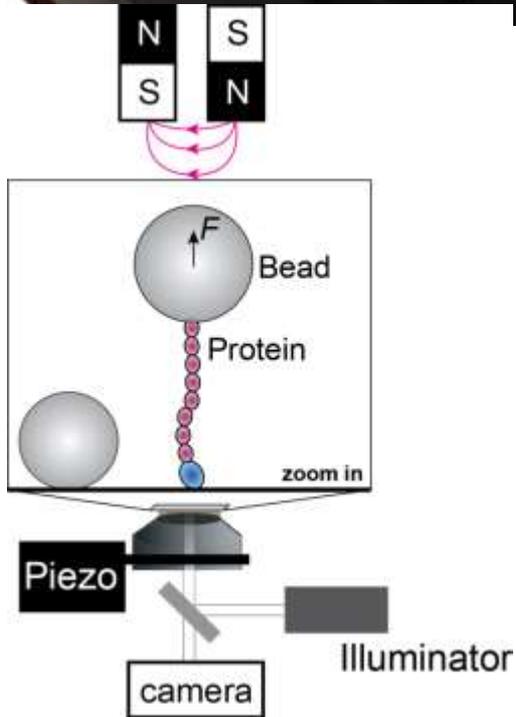
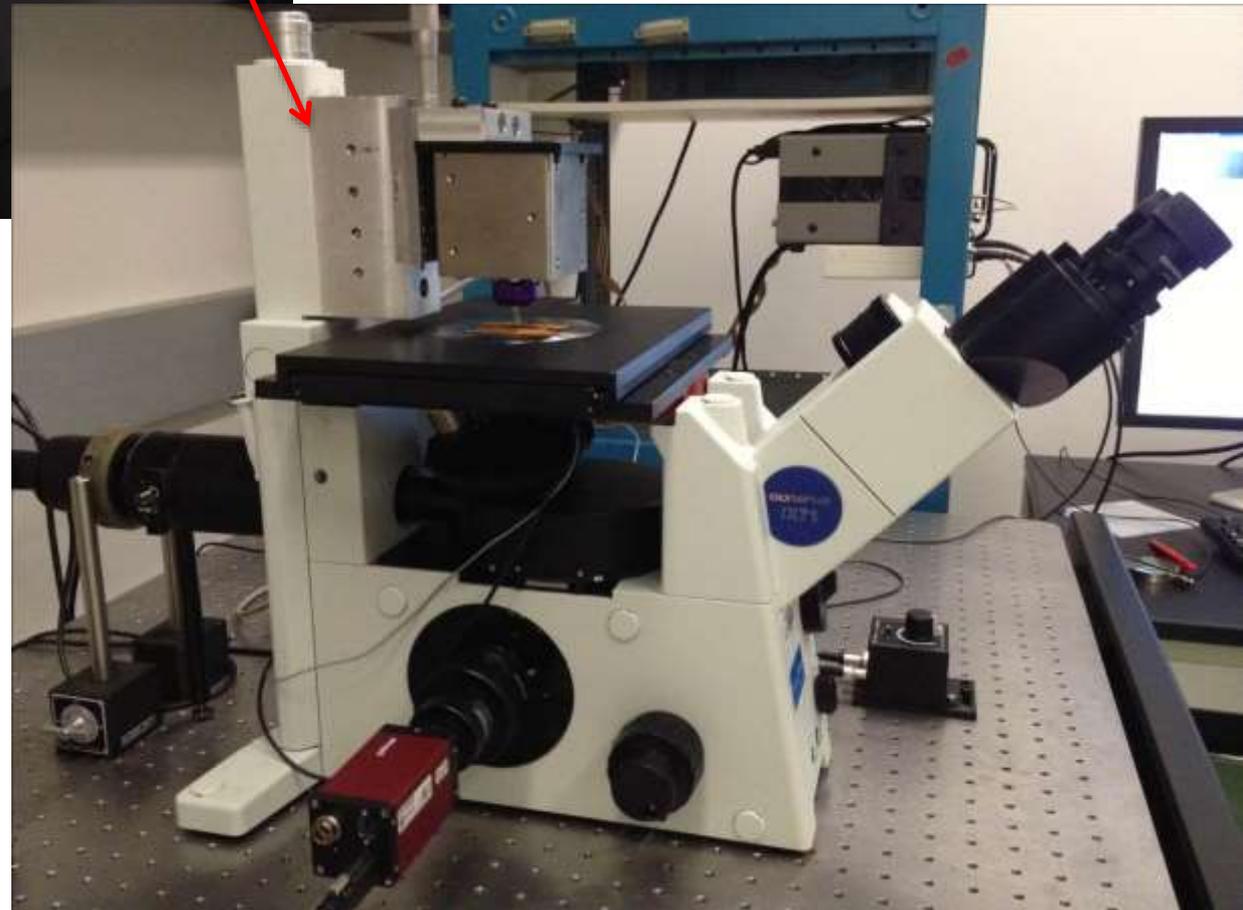
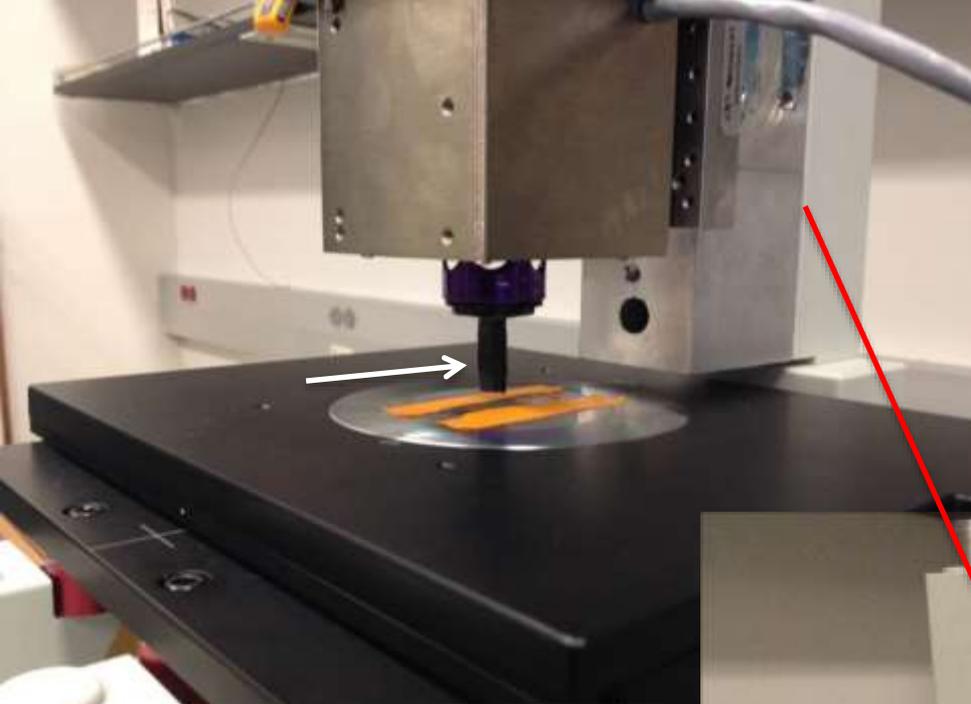
---

**MT**

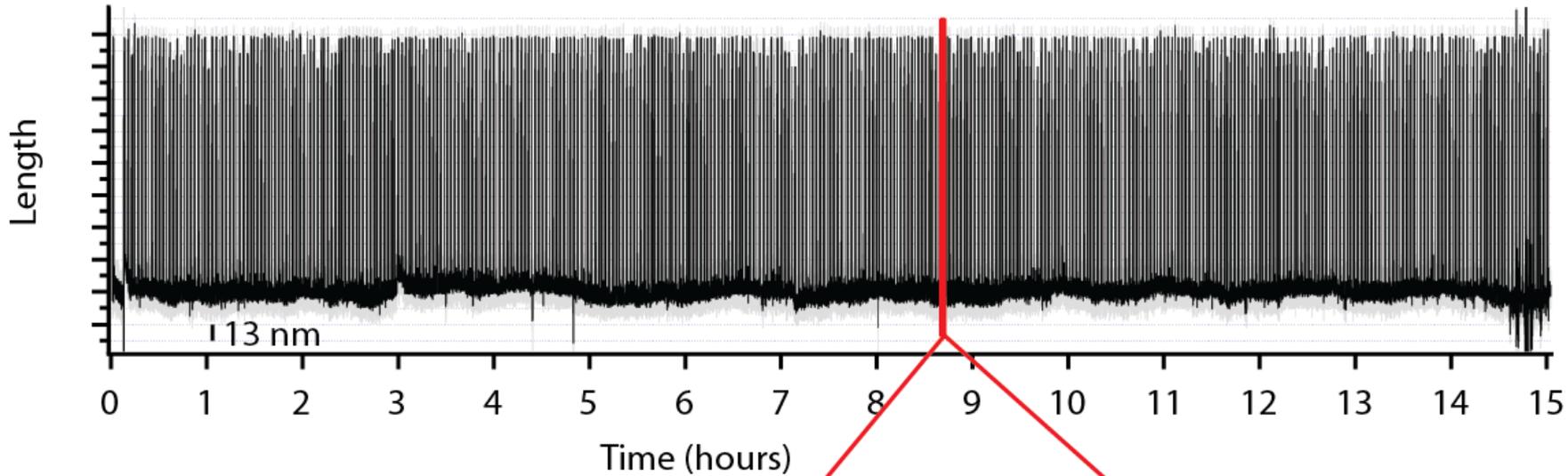
Pinzas magnéticas aplicadas  
al estudio de proteínas

---

# Pinzas magnéticas



# Ventajas e inconvenientes de las pinzas magnéticas

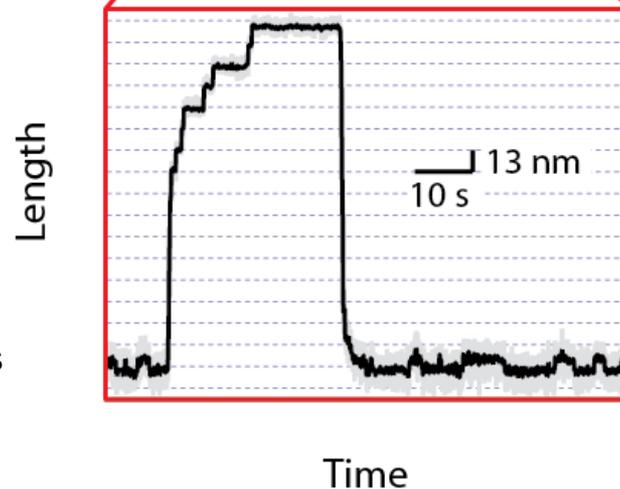


## Ventajas

- No requiere sistema de retroalimentación
- Estabilidad
- Buena sensibilidad a fuerzas  $< 20$  pN
- Posibilidad de paralelizar

## Inconvenientes

- Baja resolución temporal
- No adecuado para estudiar reacciones químicas
- No es comercial



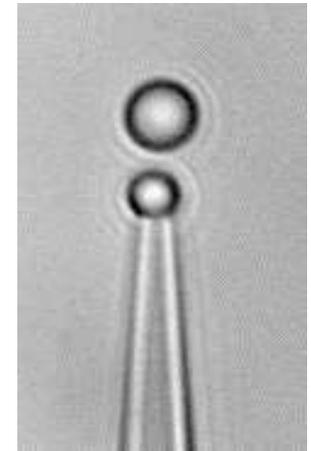
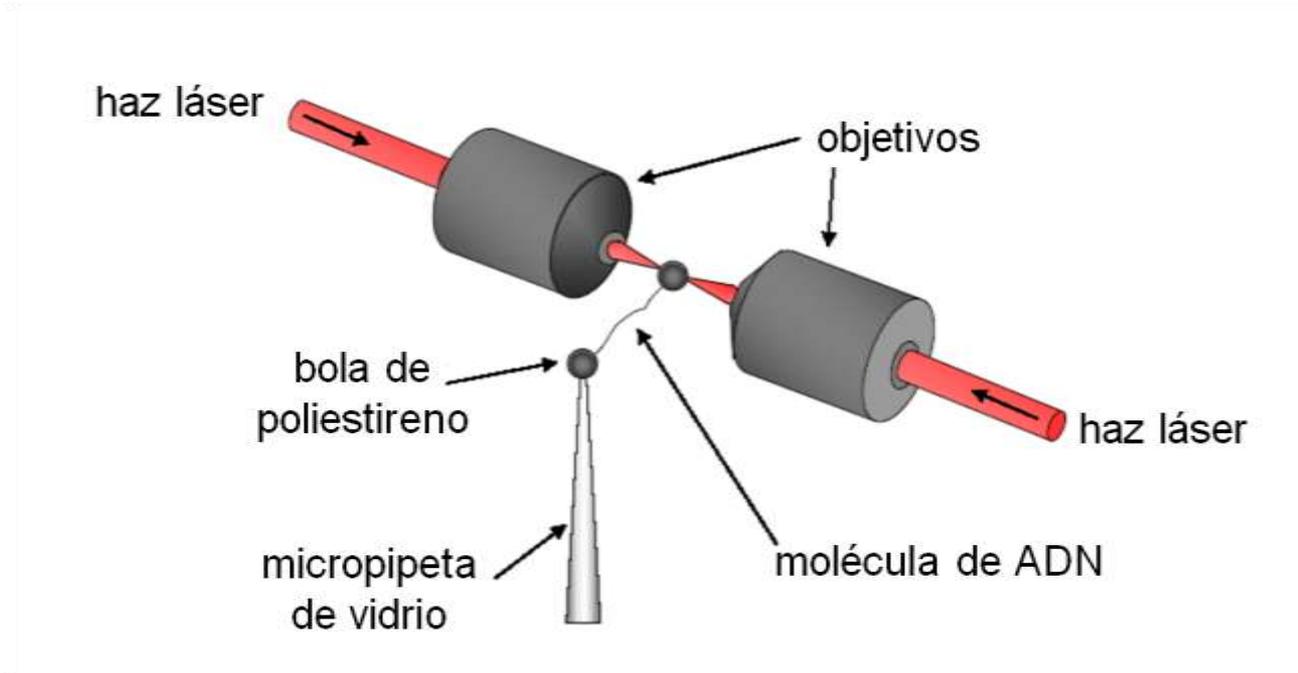
---

OT

Pinzas ópticas aplicadas  
al estudio de proteínas

---

# El fundamento de las pinzas ópticas



## Ventajas

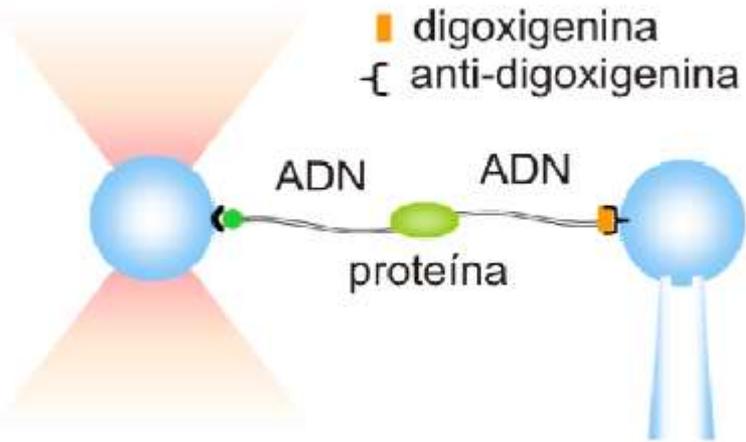
- Buena sensibilidad a fuerzas  $< 20$  pN
- Manipulación controlada: versatilidad

## Inconvenientes

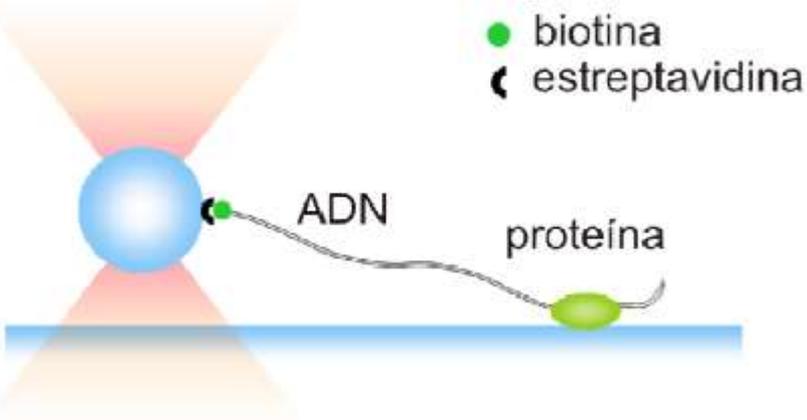
- No adecuado para mirar reacciones químicas
- Necesidad de usar asas moleculares
- Instrumentación compleja

# Configuraciones experimentales

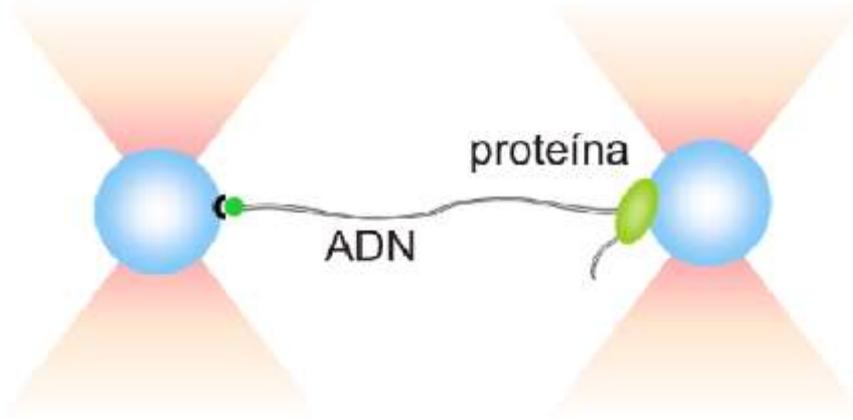
A



B

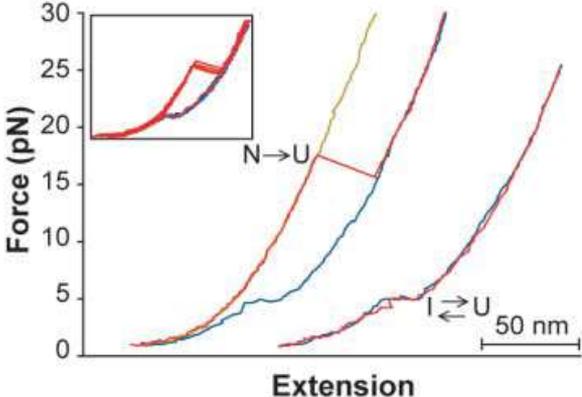
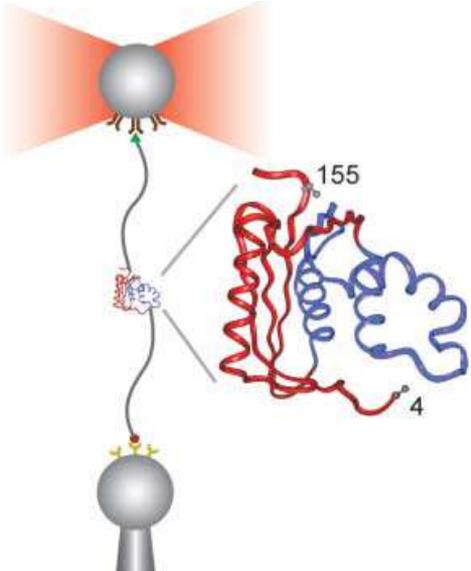


C

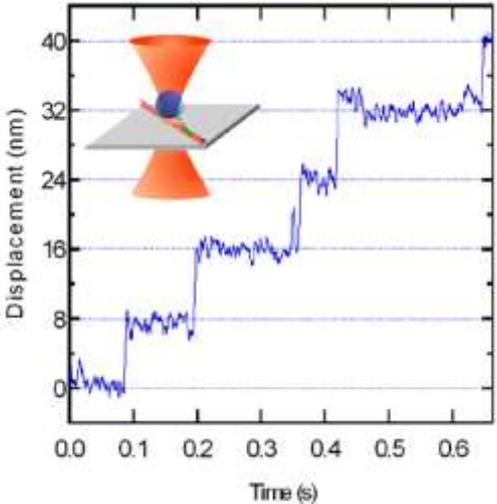
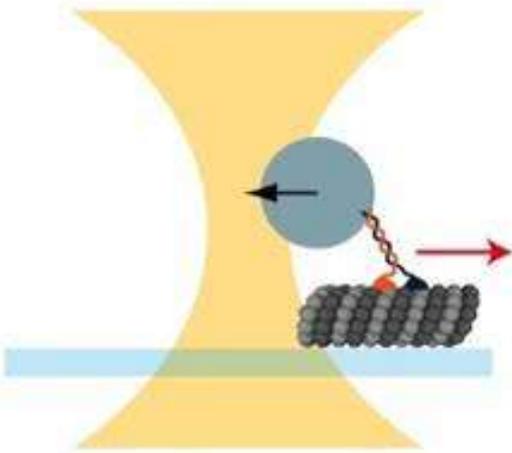


# Algunos experimentos con pinzas ópticas

Desplegamiento/  
replegamiento

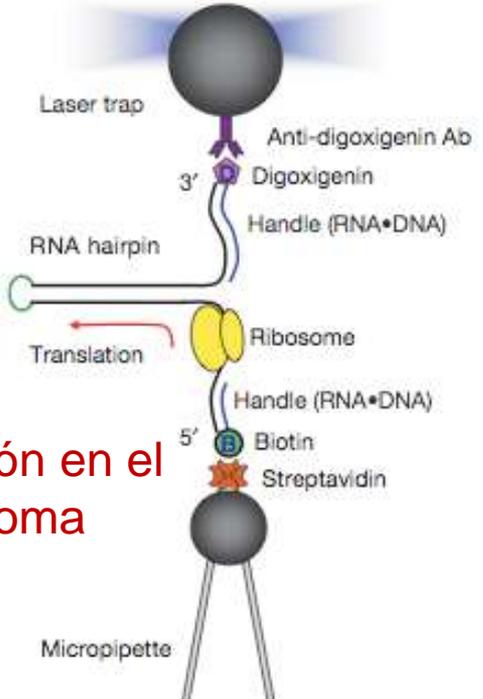
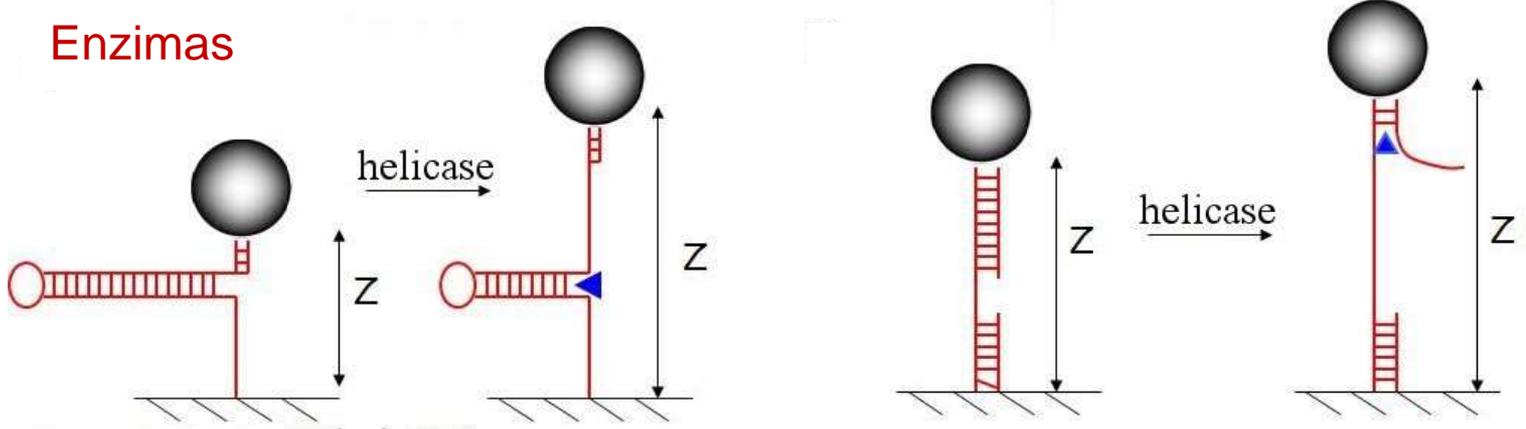


Motores  
moleculares

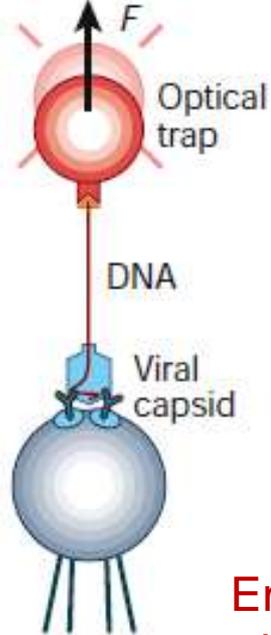


# Estudio de **motores moleculares** mediante pinzas ópticas

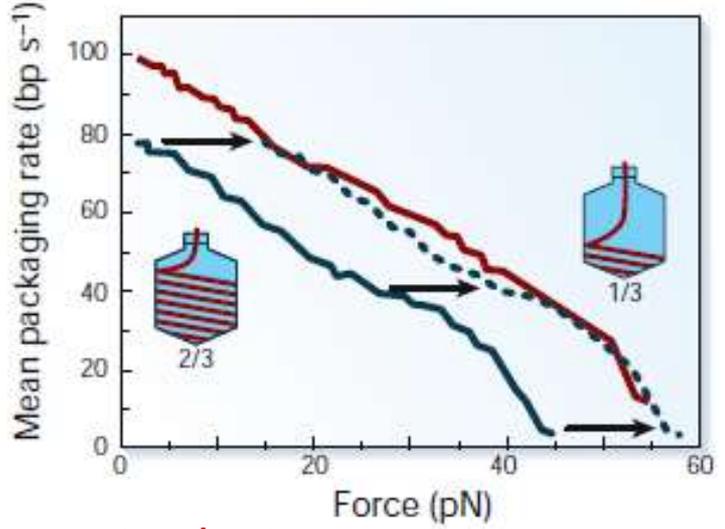
## Enzimas



**Traducción en el ribosoma**



**Empaquetamiento de DNA por virus**



# Bibliografía

---

- Joo, C., Balci, H., Ishitsuka, Y., Buranachai, C. & Ha, T. (2008) **Advances in single-molecule fluorescence methods for molecular biology**. *Annu Rev Biochem* **77**, 51-76.
- Neuman, K. C. & Nagy, A. (2008) **Single-molecule force spectroscopy: optical tweezers, magnetic tweezers and atomic force microscopy**. *Nat Methods* **5**, 491-505.
- Popa, I., Kosuri, P., Alegre-Cebollada, J., Garcia-Manyes, S. & Fernandez, J. M. (2013) **Force dependency of biochemical reactions measured by single-molecule force-clamp spectroscopy**. *Nat Protoc* **8**, 1261-1276.