
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

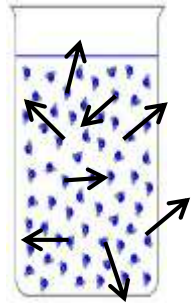
Al medir **propiedades promedio** perdemos información



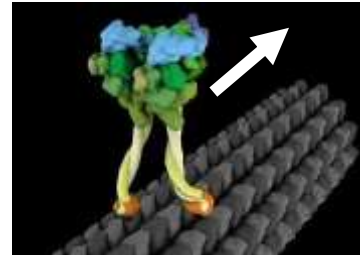
Ejemplo escuchado a **Steve Block**,
uno de los pioneros de las pinzas ópticas

Interés del estudio de moléculas individuales

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

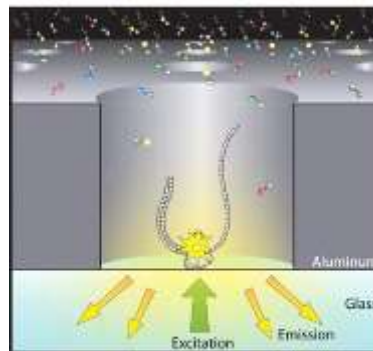


En un tubo de ensayo
la **orientación
molecular es aleatoria**



Motores moleculares

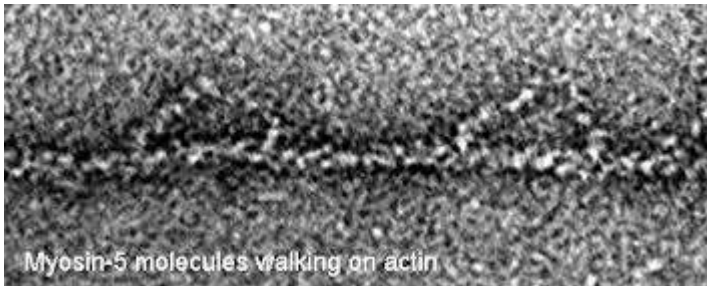
- **Paralelización** : secuenciación de ADN de última generación



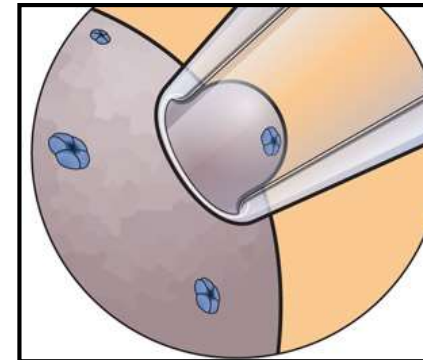
Los primeros experimentos de molécula individual

Técnicas de molécula individual

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



Microscopio electrónico
E. Ruska
Premio Nobel de Física, 1986

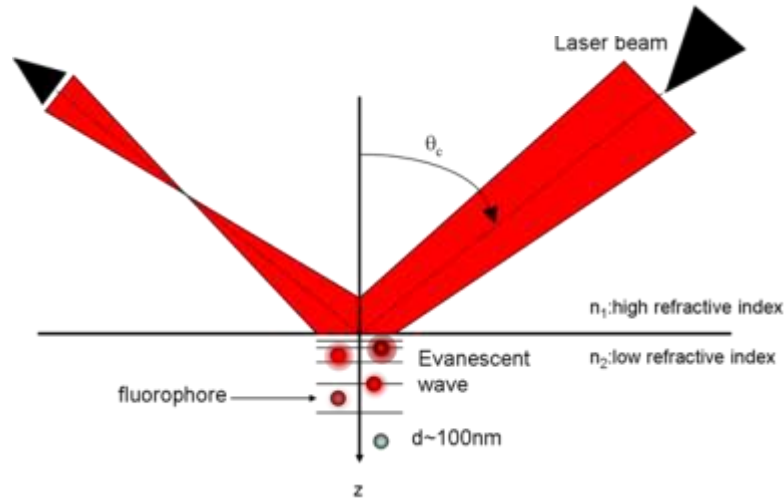


Patch clamp (electrofisiología)
E. Neher y B. Sakmann
Premio Nobel de Fisiología o Medicina, 1991

Fluorescencia de molécula individual
aplicada al estudio de proteínas

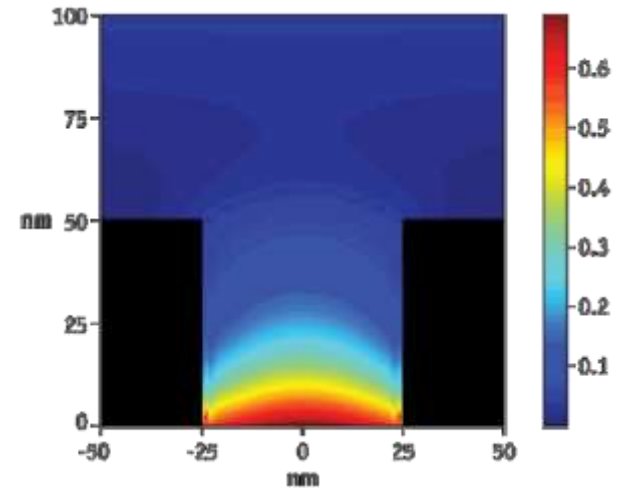
Observación mediante fluorescencia de molécula individual

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



TIRF

(Fluorescencia de reflexión interna total)



Zero-mode waveguides

- Optimización de **fluoróforos**



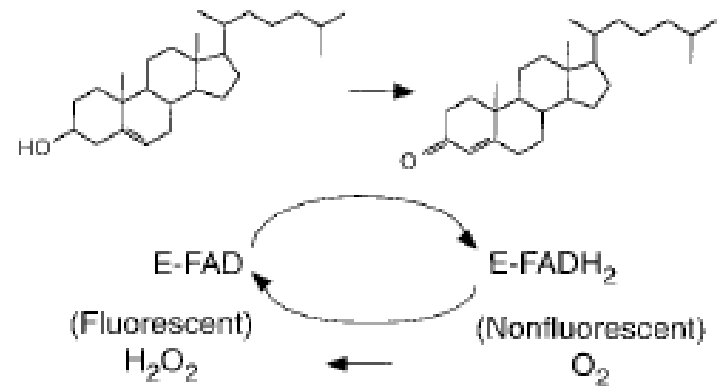
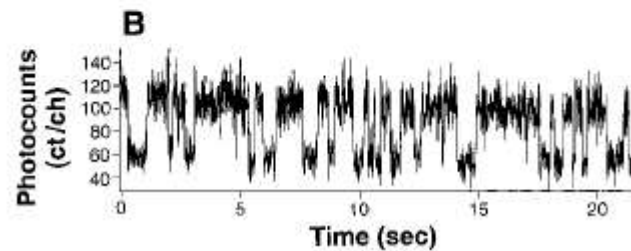
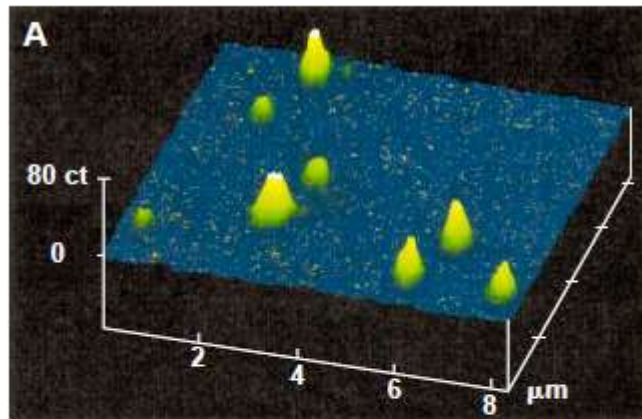
Conjugación química

- Mejores cámaras**



Proteínas fluorescentes

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



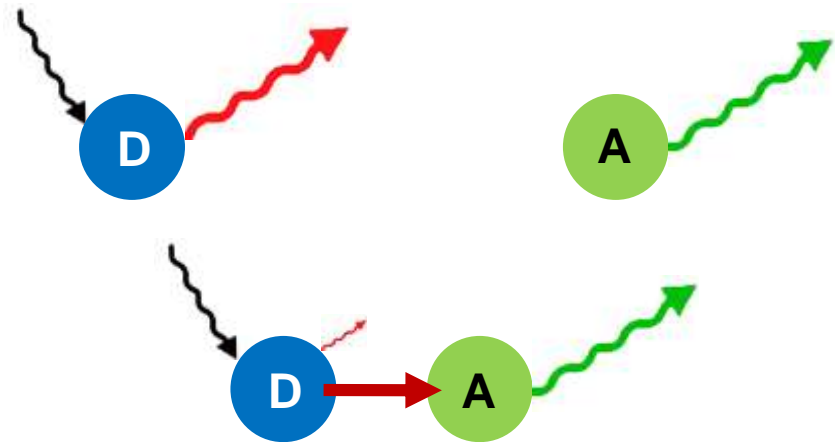
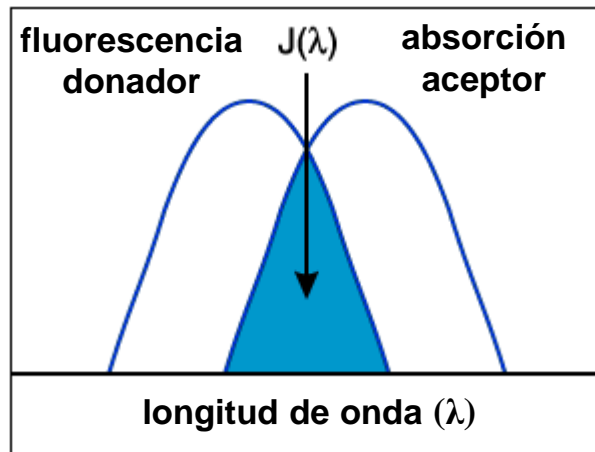
Las **enzimas fluctúan** entre estados de alta y baja actividad

Transferencia de energía por resonancia Förster (FRET)

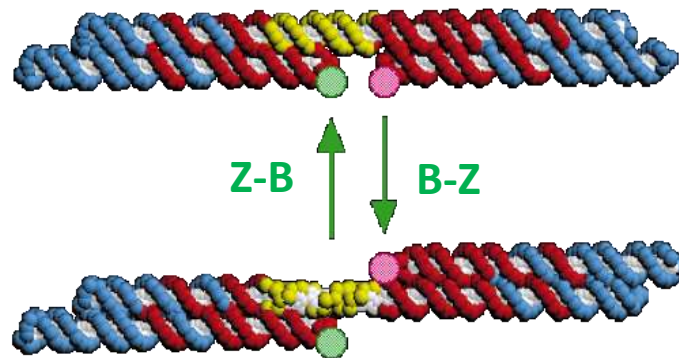
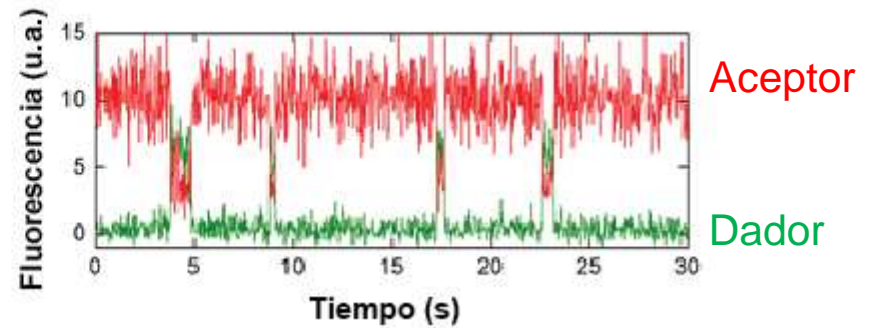
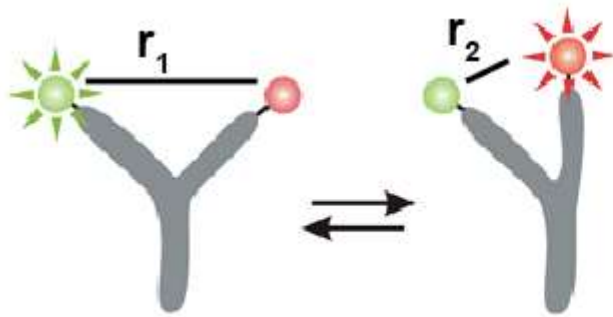
Eficiencia FRET

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

$R_0 = f$ (solapamiento espectral, orientación)



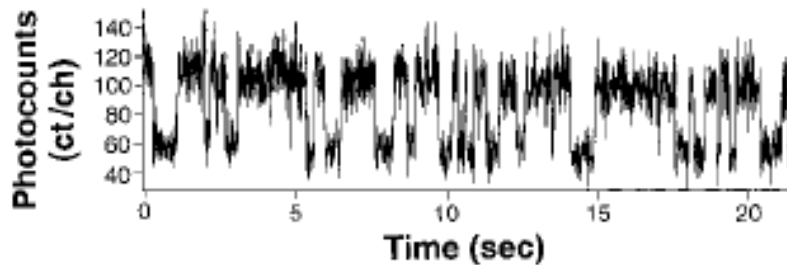
Medida de cambios conformacionales mediante FRET



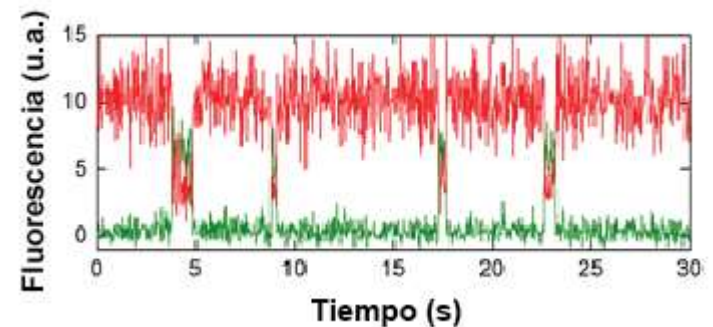
Huella dactilar (*fingerprint*) en experimentos de molécula individual

Dos obligaciones del investigador:

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



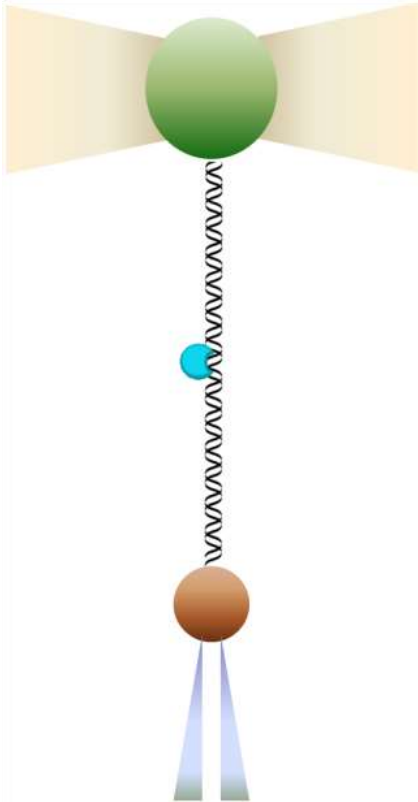
Colesterol oxidasa



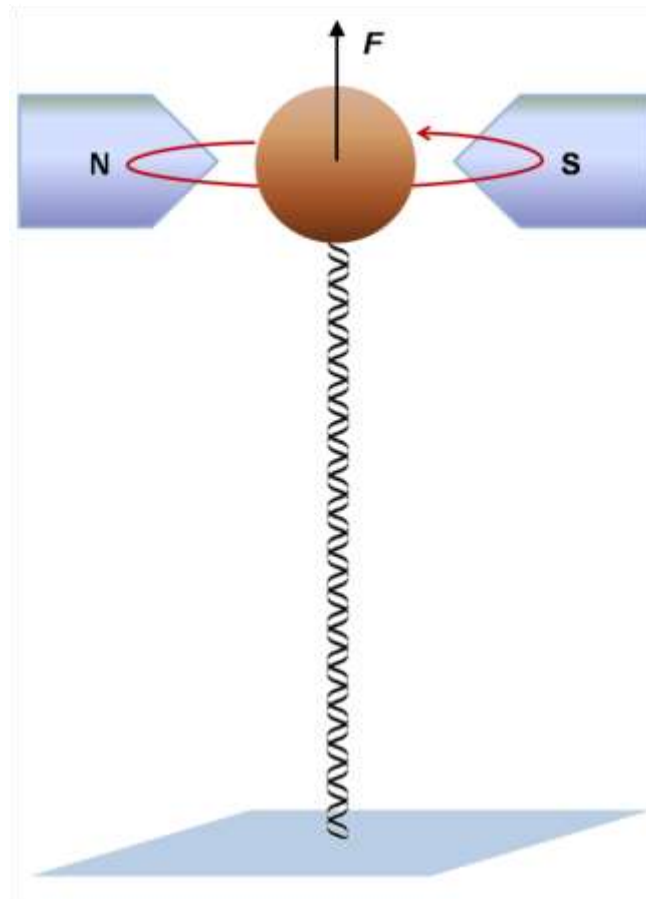
Cambio conformacional
(FRET)

Técnicas de **manipulación** de moléculas individuales

Pinzas Ópticas



Pinzas Magnéticas



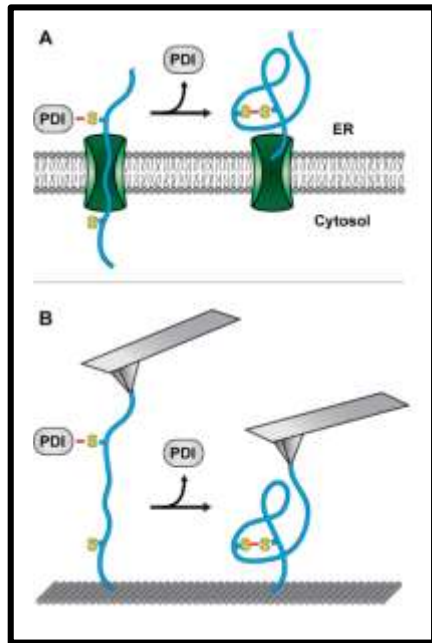
Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)



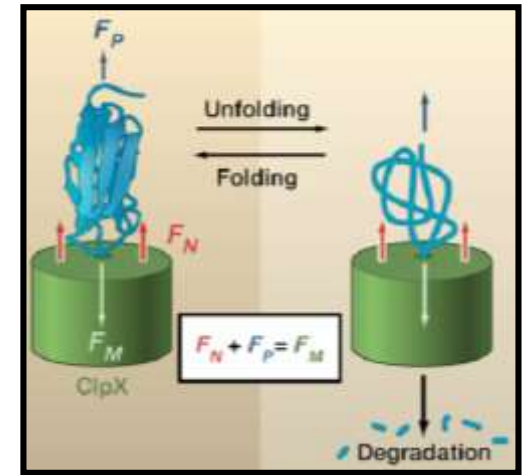
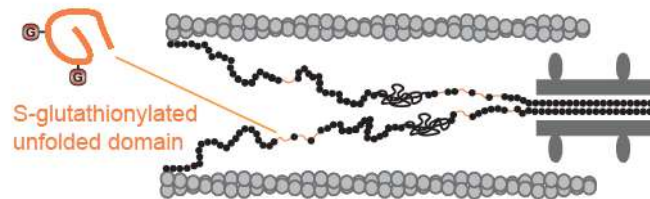
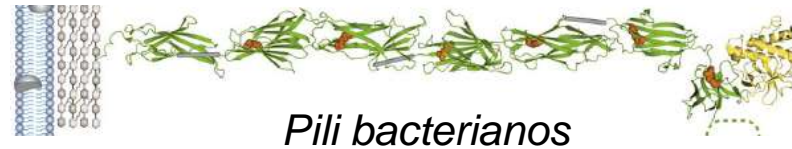
AFM

Microscopía de fuerza atómica
aplicada al estudio de proteínas

Fuerzas mecánicas y proteínas: desde el nacimiento a la muerte

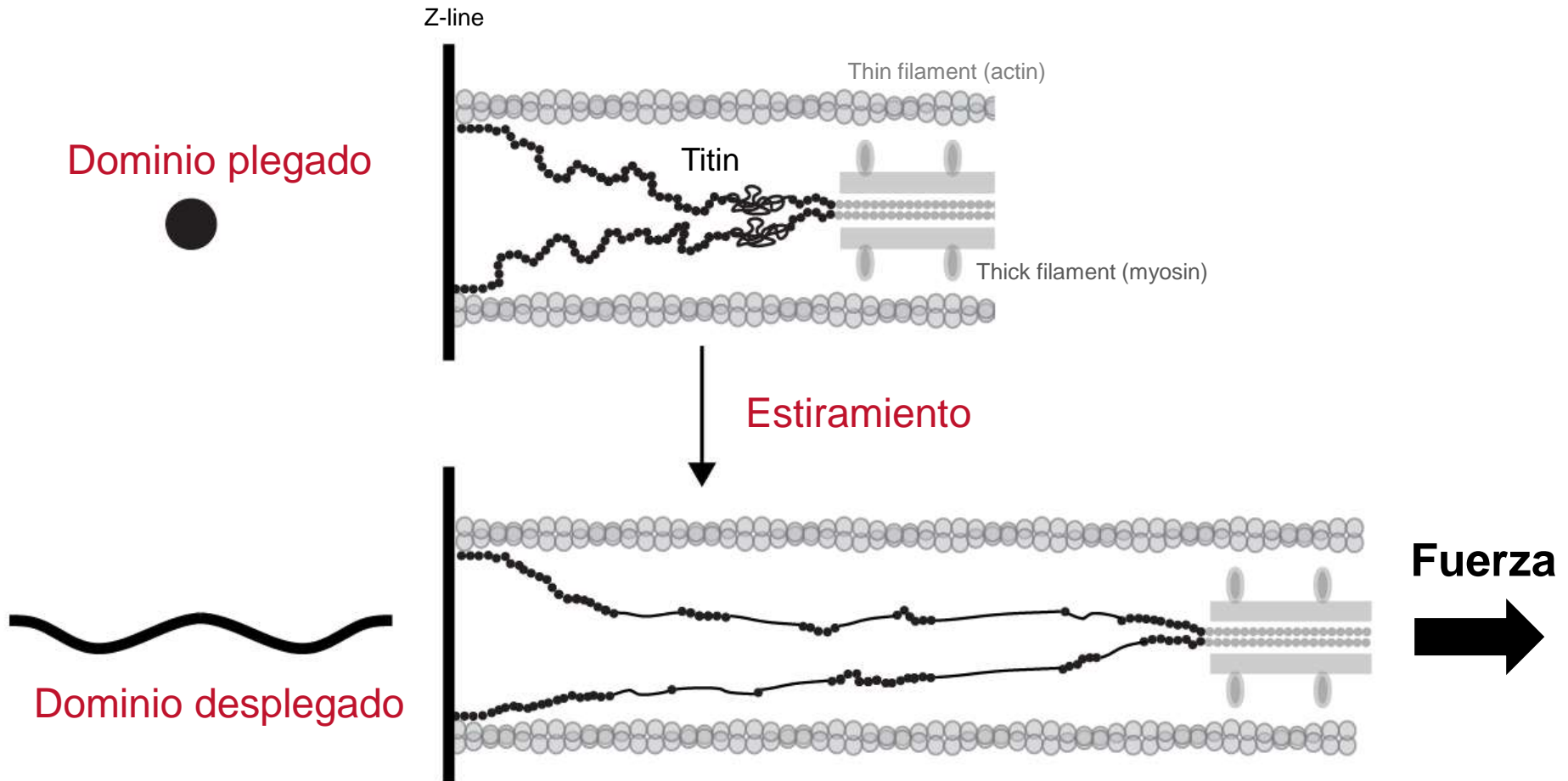


Síntesis de proteínas
Plegamiento oxidativo

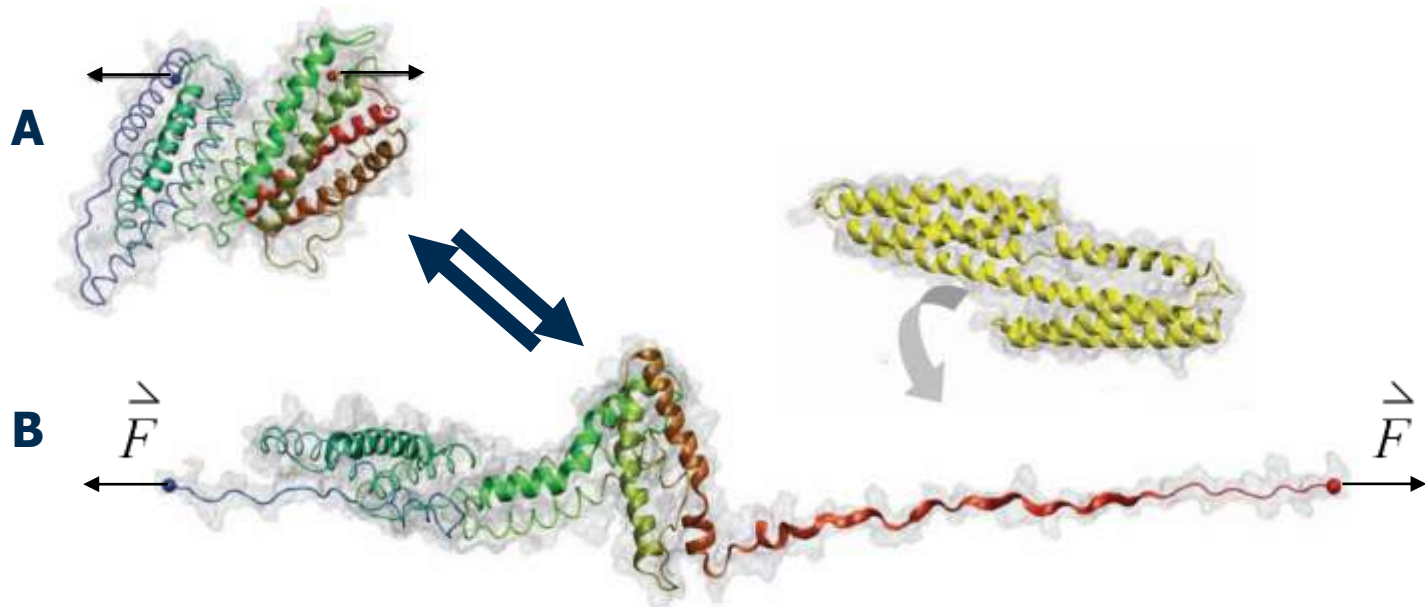


Degradación en
proteosoma

La elasticidad de las proteínas y el desplegamiento mecánico

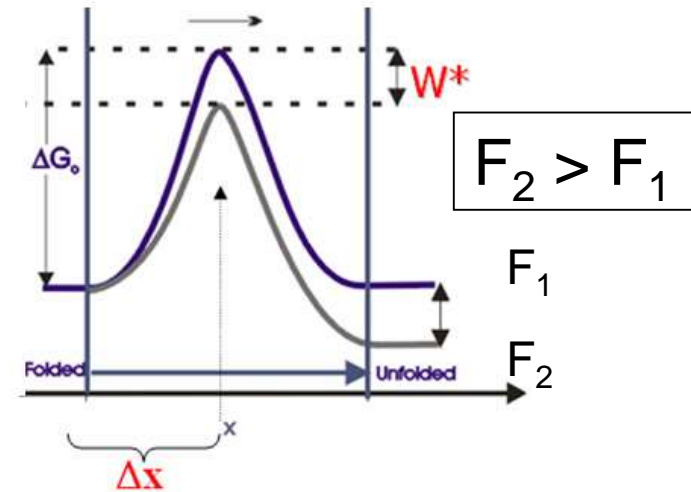
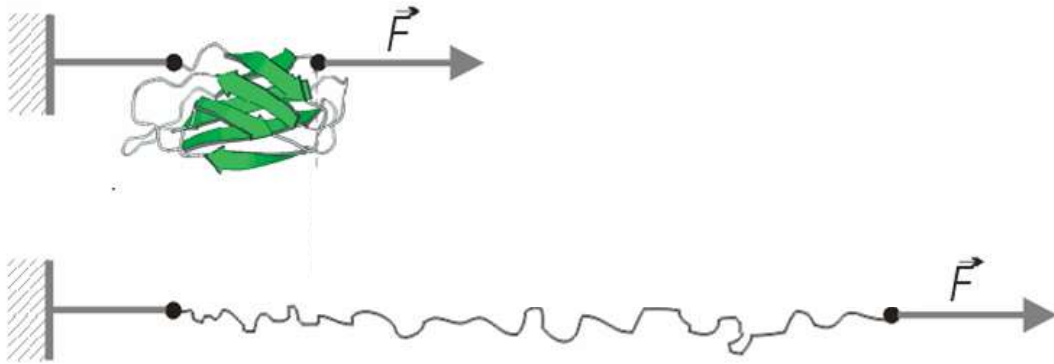


Fuerzas mecánicas y exposición de **sitios crípticos**



Detección de señales mecánicas: **mecanotransducción**

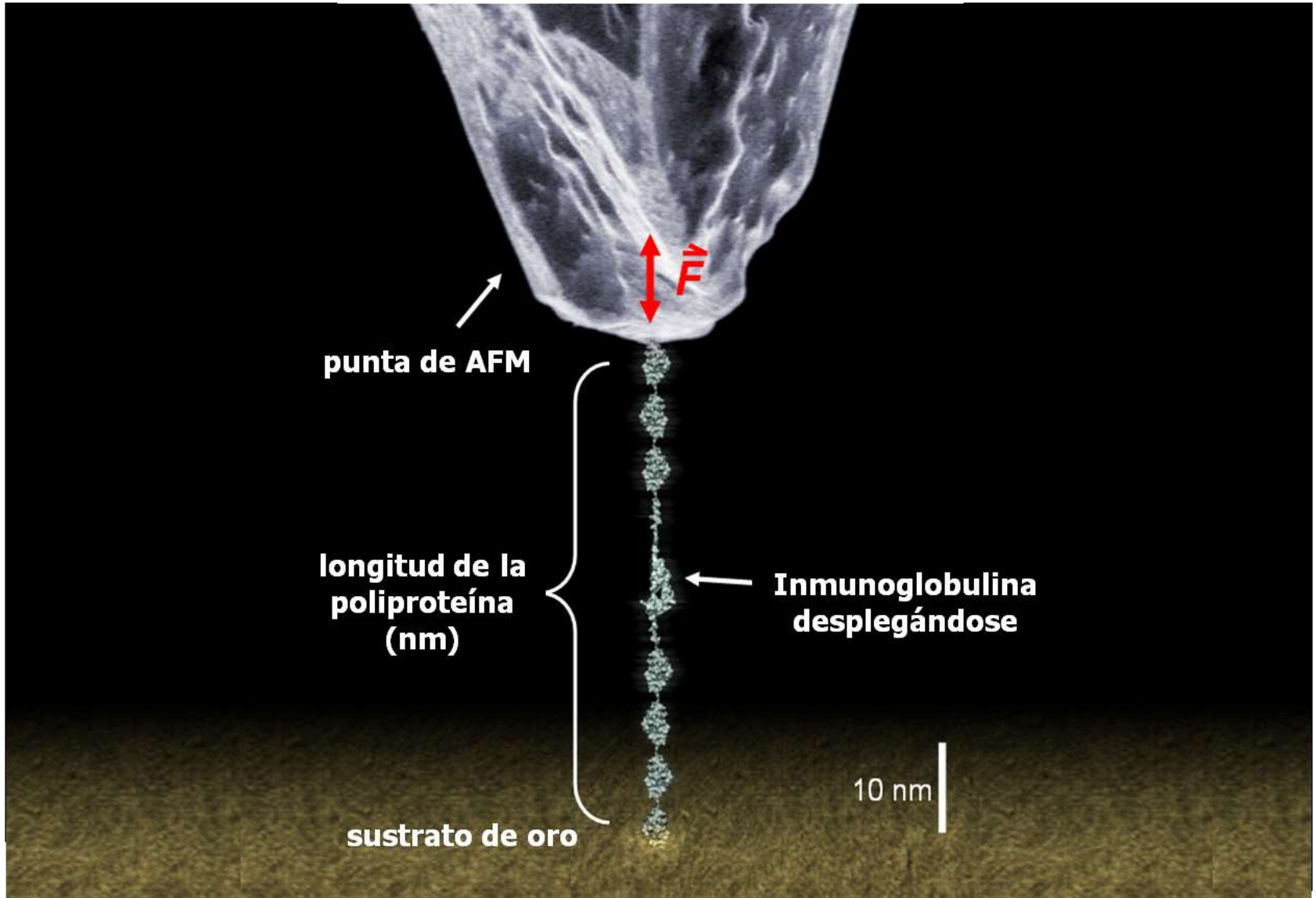
Fuerzas mecánicas como desnaturalizantes de proteínas



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

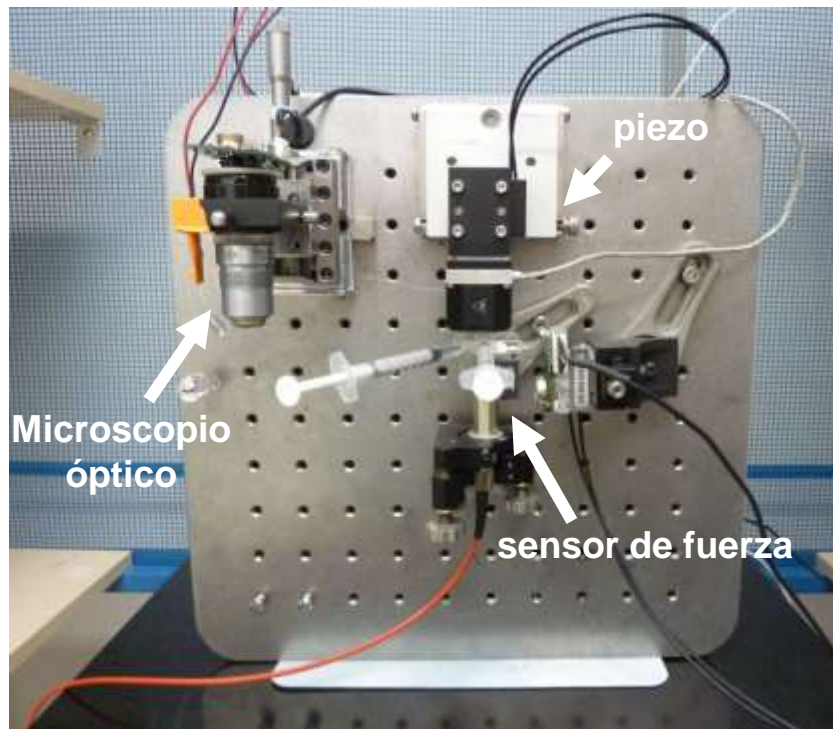
$$k_u = k_u^0 e^{F\Delta x / kT}$$

El AFM como aplicador de fuerzas

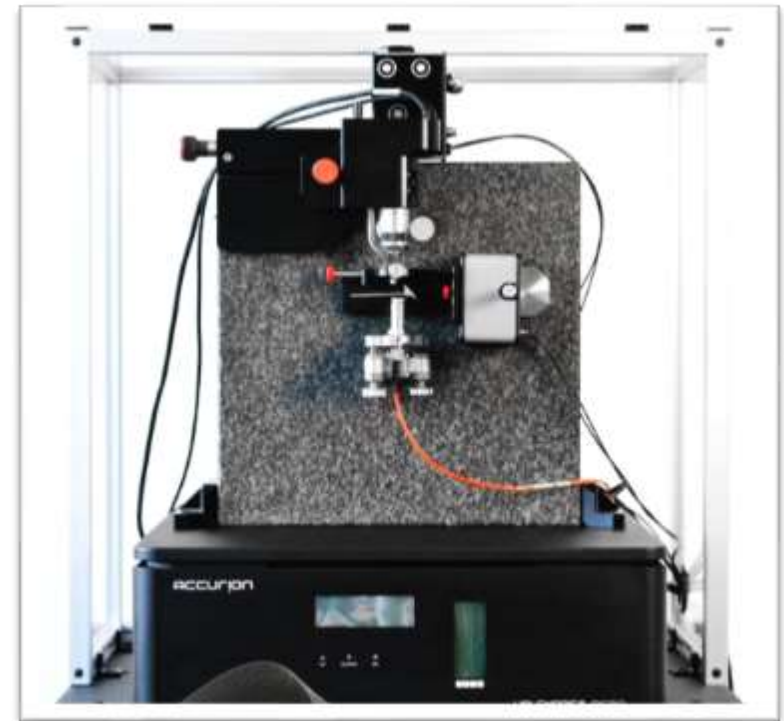


Espectrómetros de AFM

AFM casero

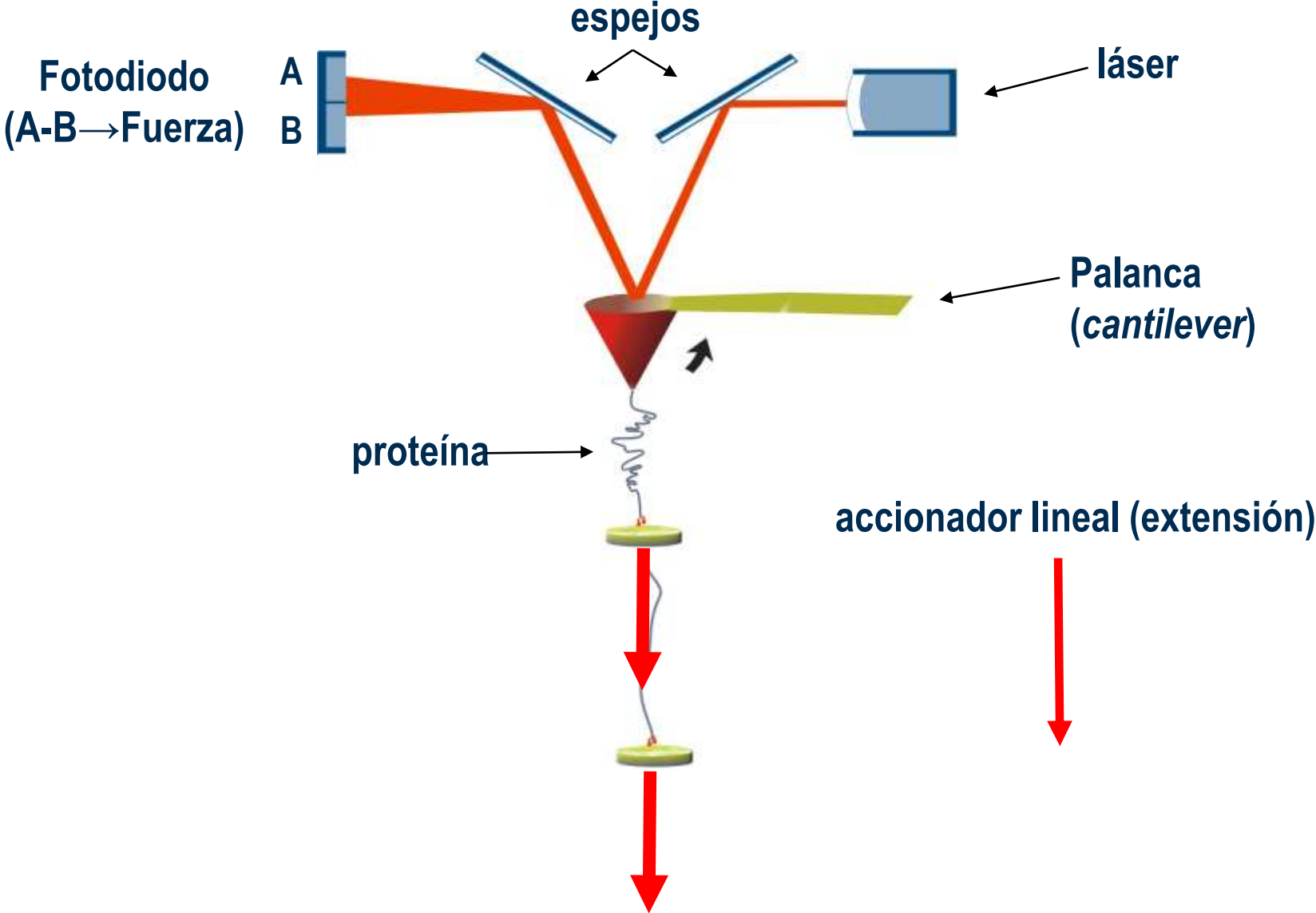


AFM comercial (100K Euro)



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

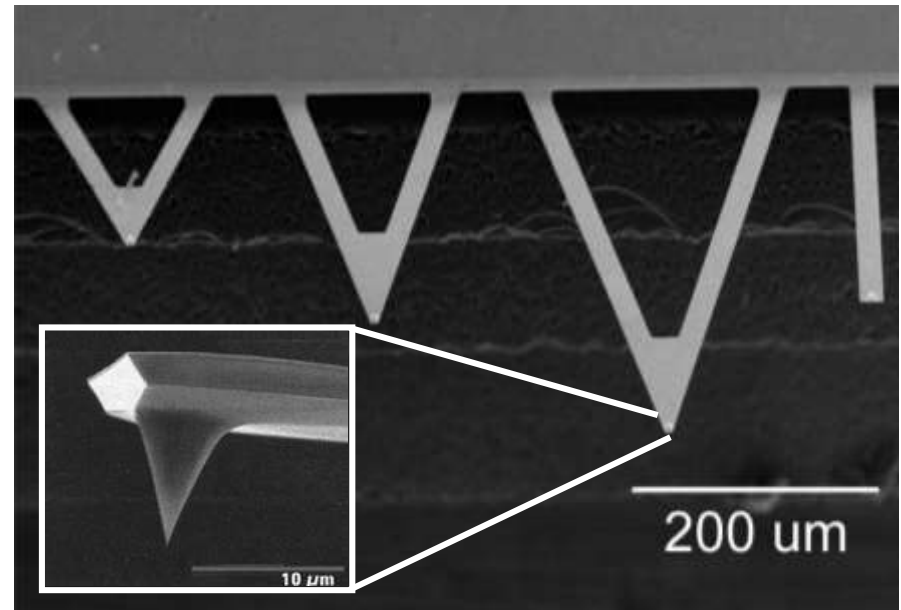
The cantilever orientation of Bruker's Silicon Nitride probe 10-packs is indicated below, with "top" indicating upward in the box, and "bottom" indicating downward in the box.

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

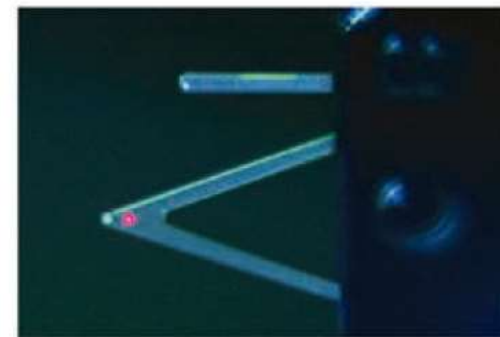
3601 Calle Torrey Pines C, Camarillo, CA 93012

One Cantilever	Four Cantilevers	Six Cantilevers
<ul style="list-style-type: none">A on topProducts: ScanAsyst-Air, ScanAsyst-Fluid, ScanAsyst-Fluid+	<ul style="list-style-type: none">A & B on topC & D on bottomProducts: SNL, DNP, DNPS, NP, NPS, NPQ, NPG, NPUC	<ul style="list-style-type: none">A on topB, C, D, E, F on bottomProducts: MSNL, MLCT, MSCT, MLCTO, MLCTUC, MSCTUC



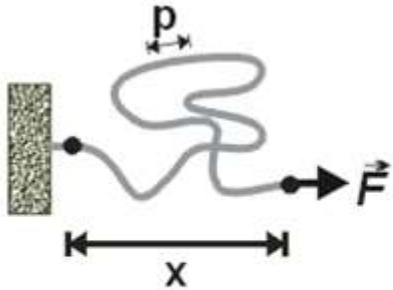
Escoger el cantilever adecuado: la **constante de muelle** (*spring constant*)

5-20 pN/nm



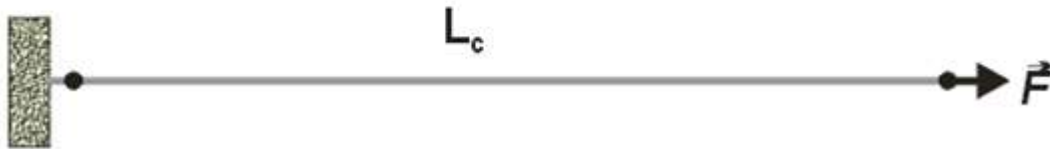
Enfoque del láser

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

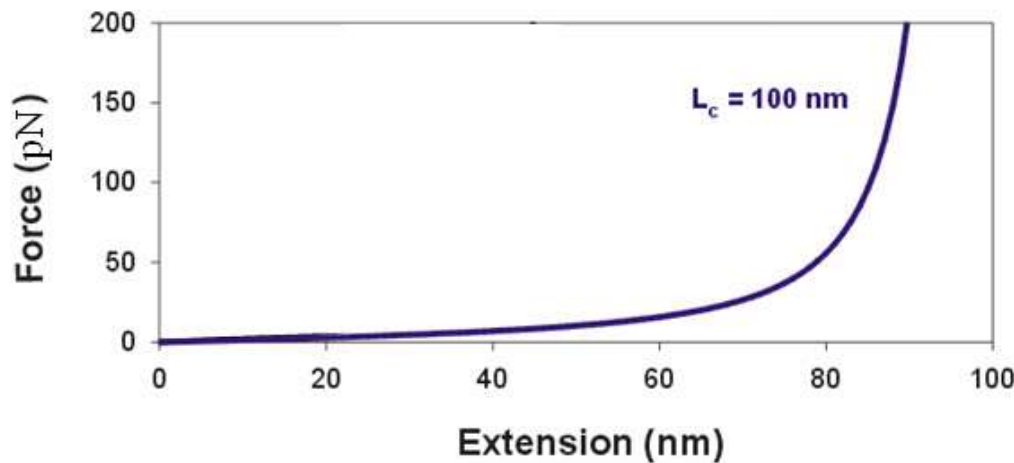


$$F(x) = \frac{kT}{p} \left[\frac{1}{4} \left(1 - \frac{x}{L_c} \right)^{-2} - \frac{1}{4} + \frac{x}{L_c} \right]$$

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

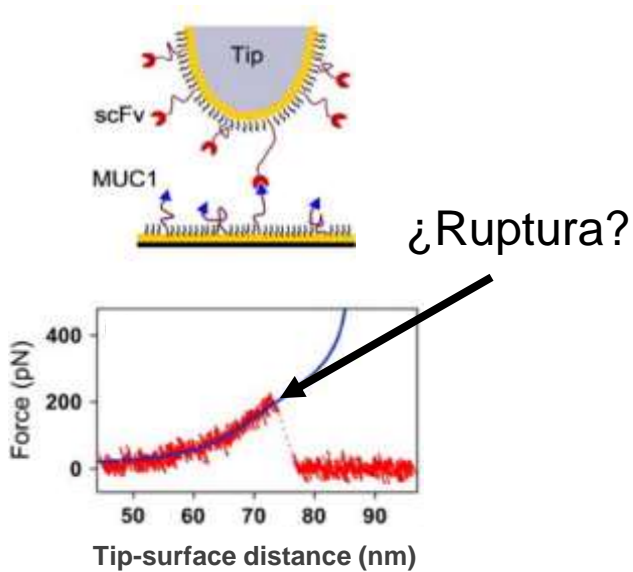


p (ssDNA) \ll p (dsDNA)



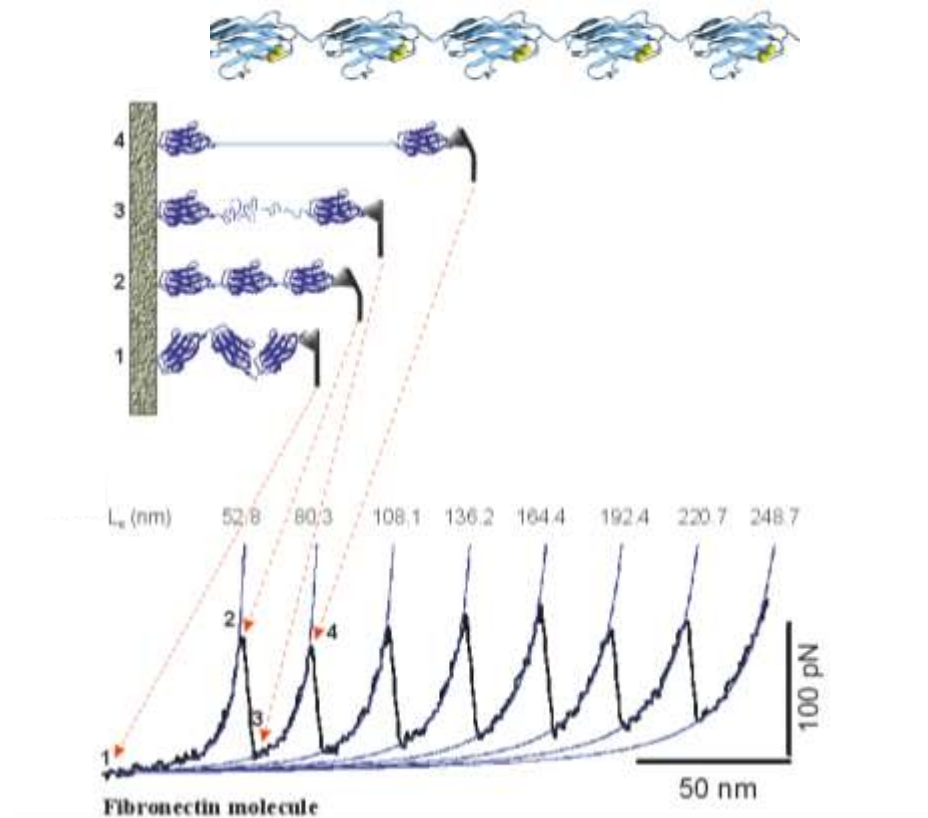
La importancia del *fingerprint* en AFM

Ruptura de enlace



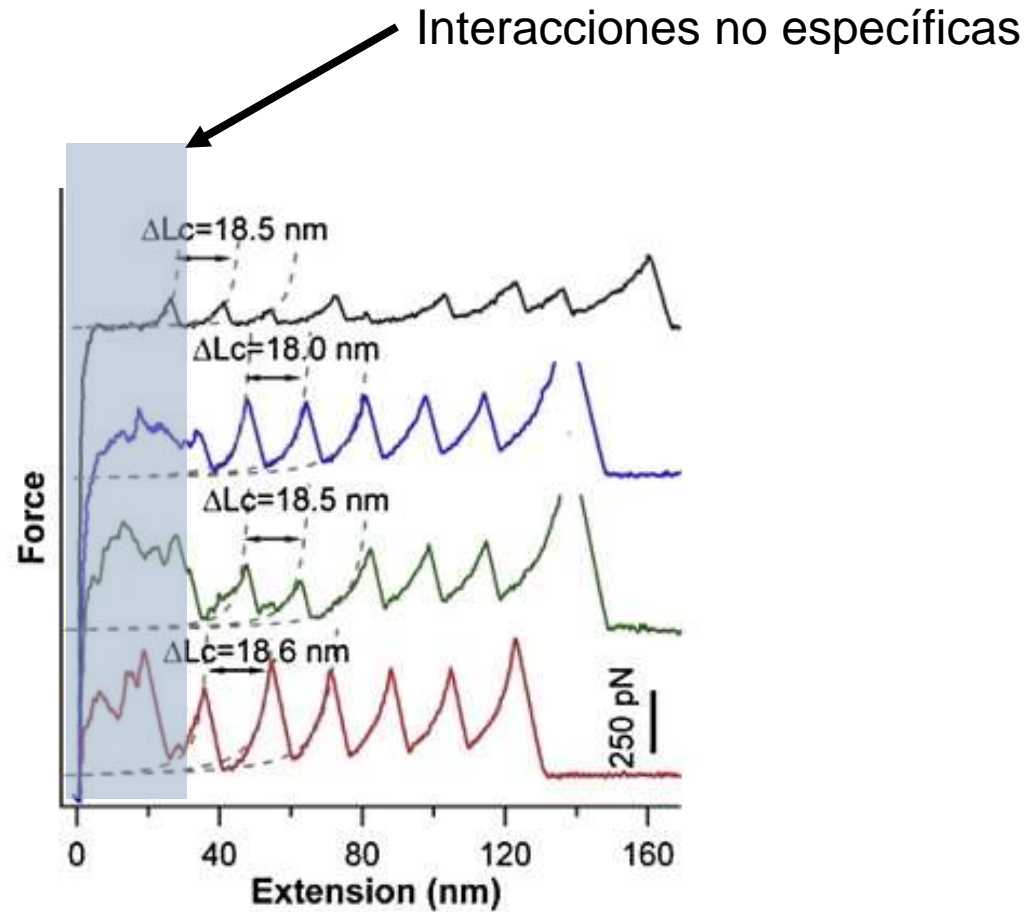
Distancia

Desplegamiento de poliproteínas

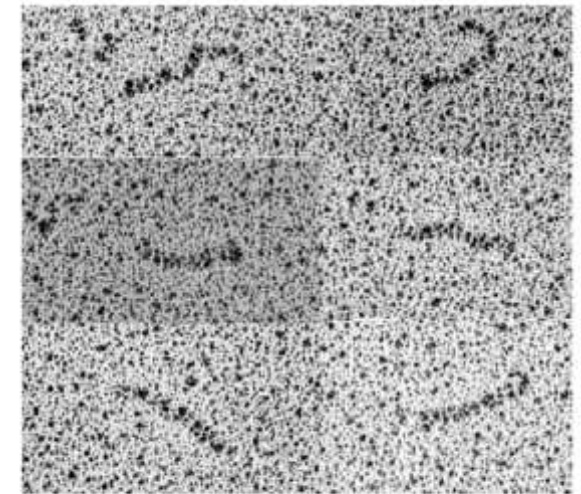
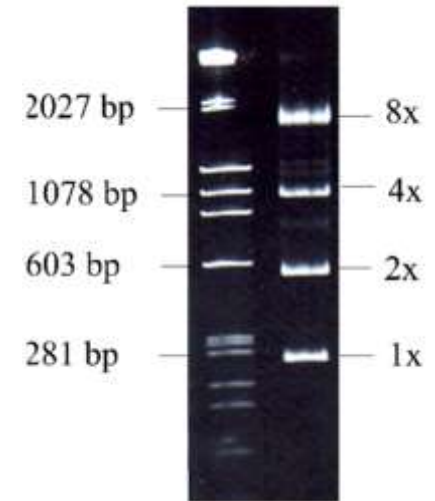
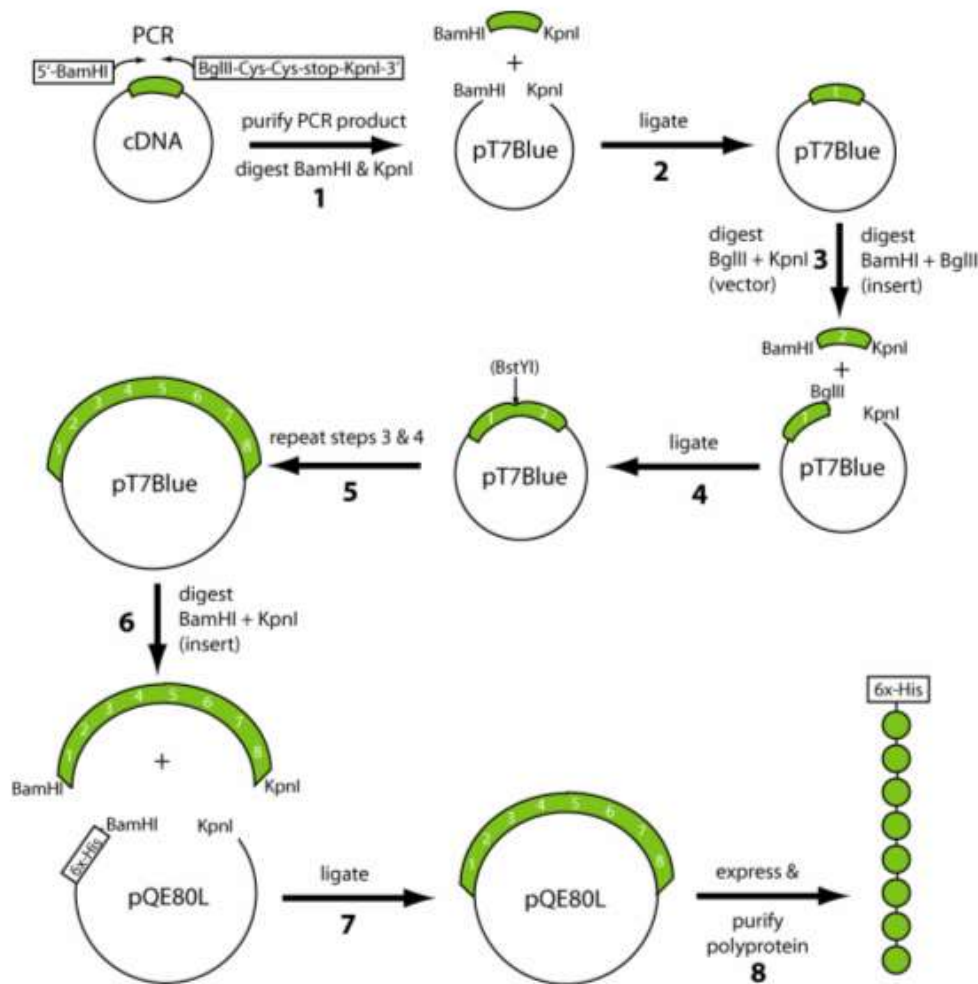


Patrón repetitivo (*sawtooth*)

Interacciones no específicas ocurren cerca de la superficie



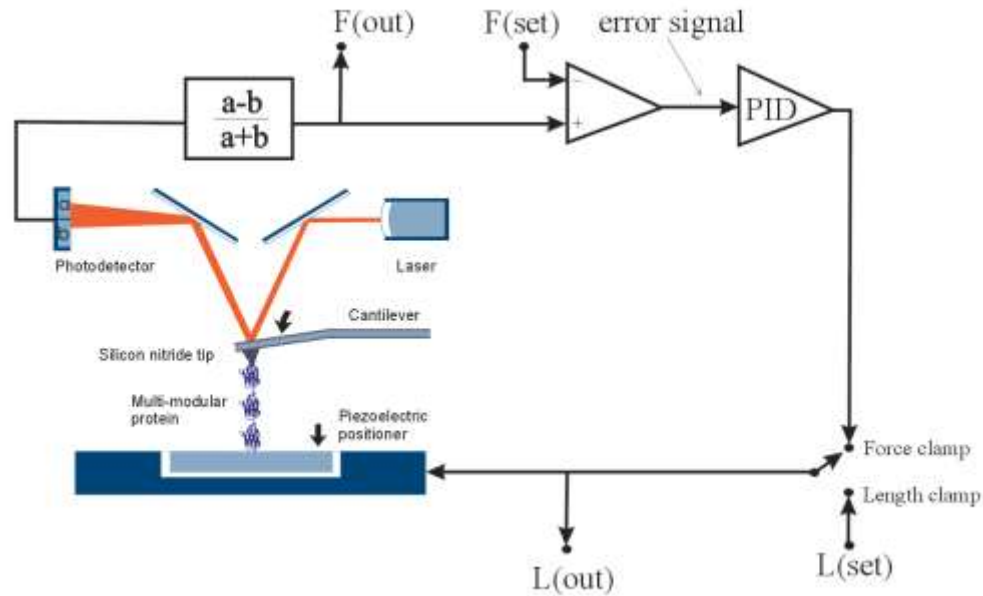
Ingeniería de poliproteínas



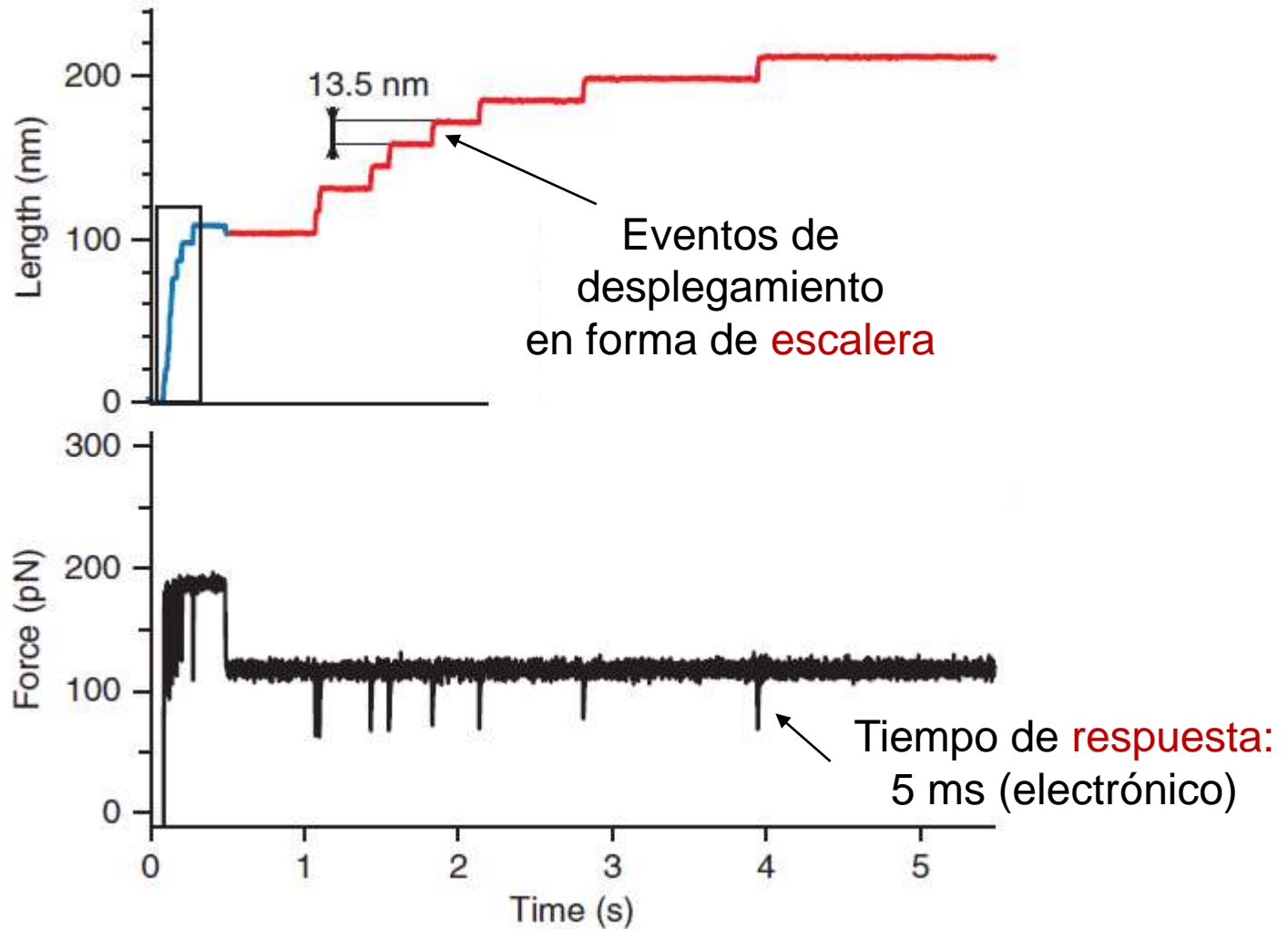
50 nm

Experimentos a fuerza constante: *force-clamp*

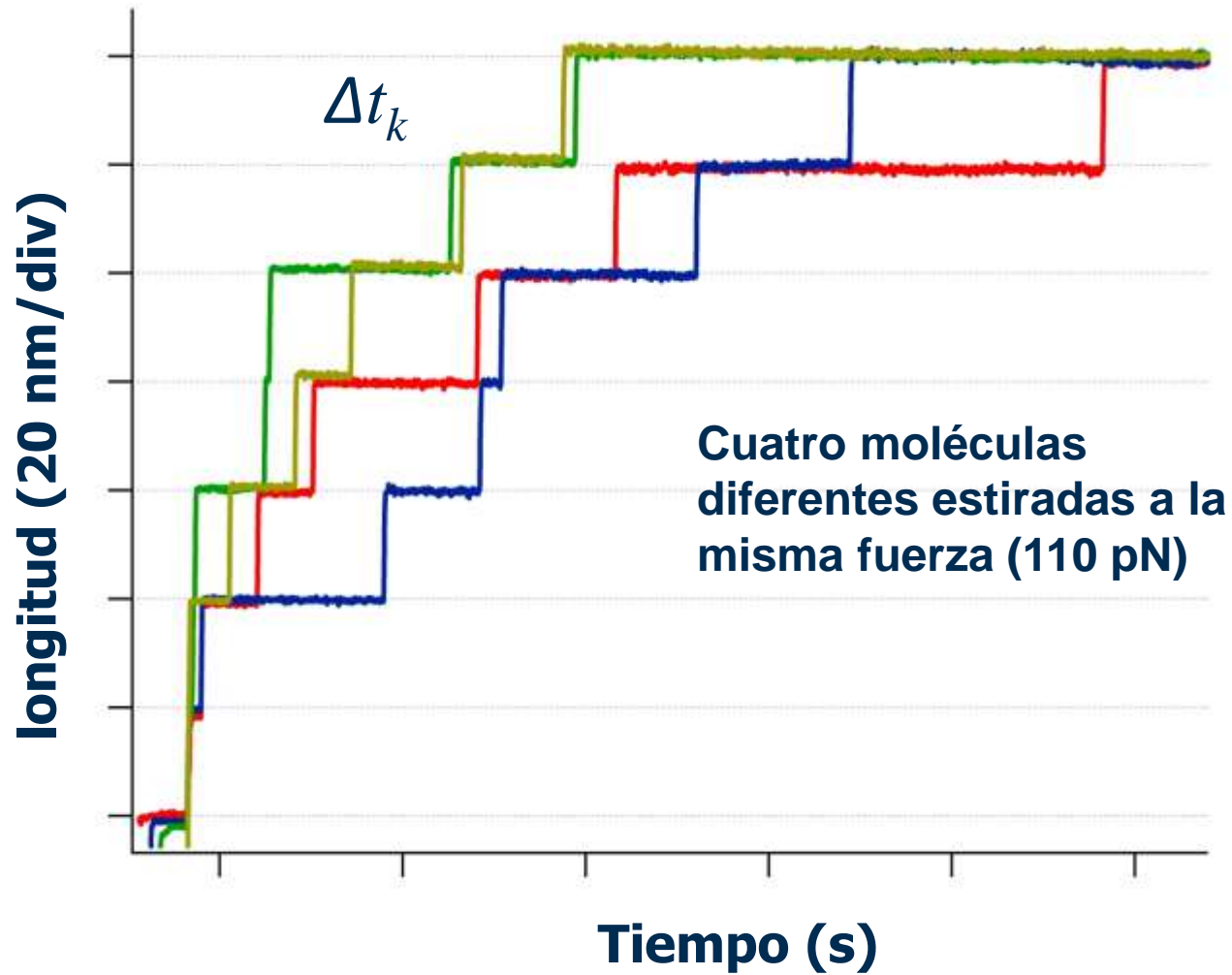
- ¿Cómo medimos **dependencias con la fuerza**?
- El uso de **sistemas de retroalimentación** permite mantener la fuerza constante



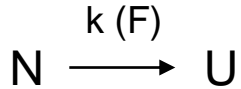
Un ejemplo de un registro experimental **a fuerza constante**



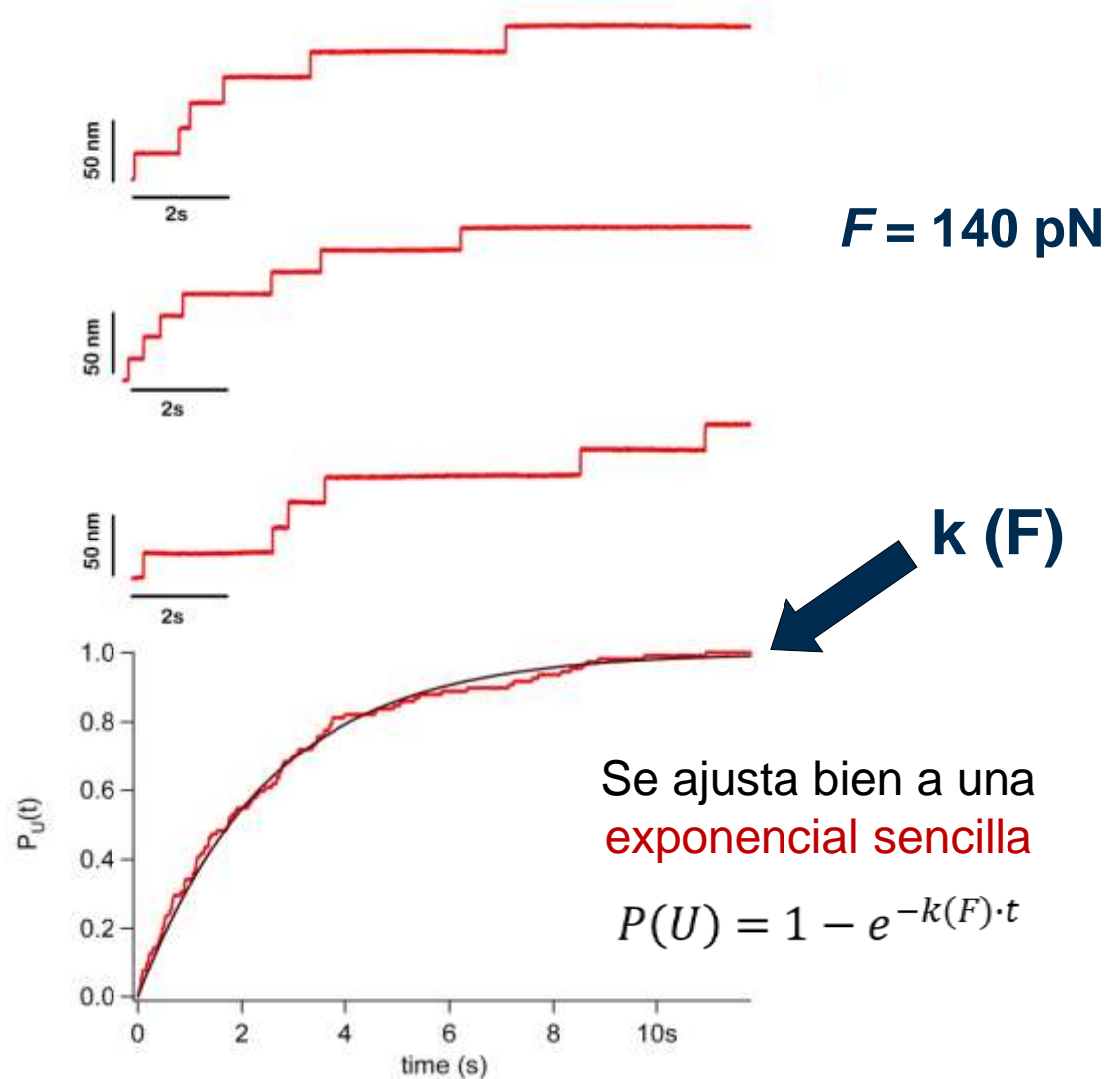
Naturaleza **probabilística** de los eventos de desplegamiento



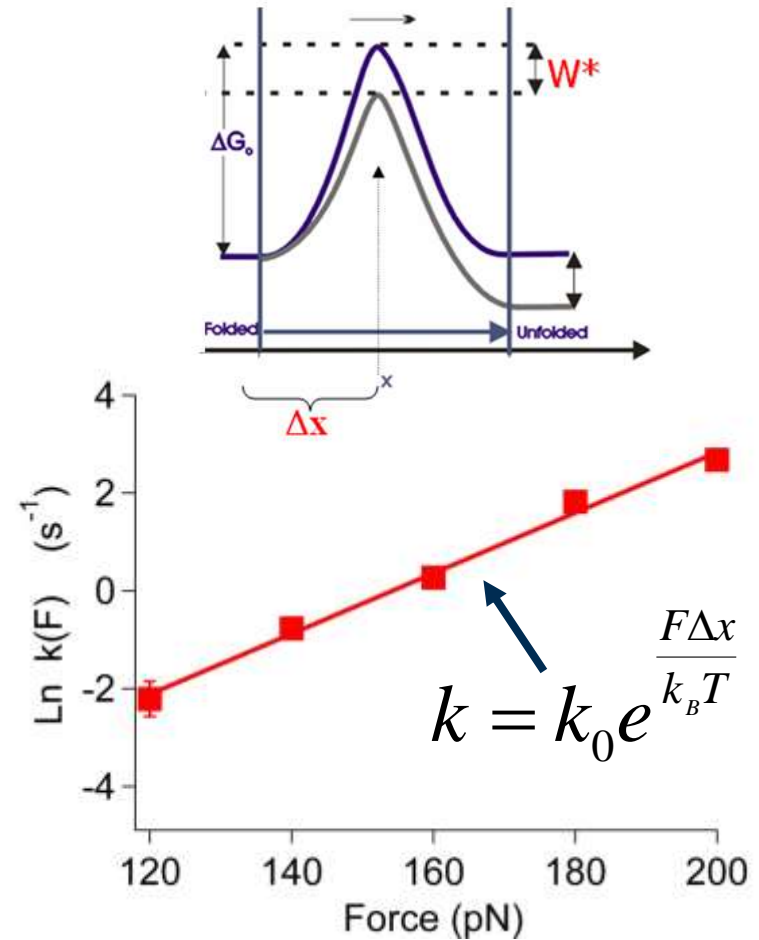
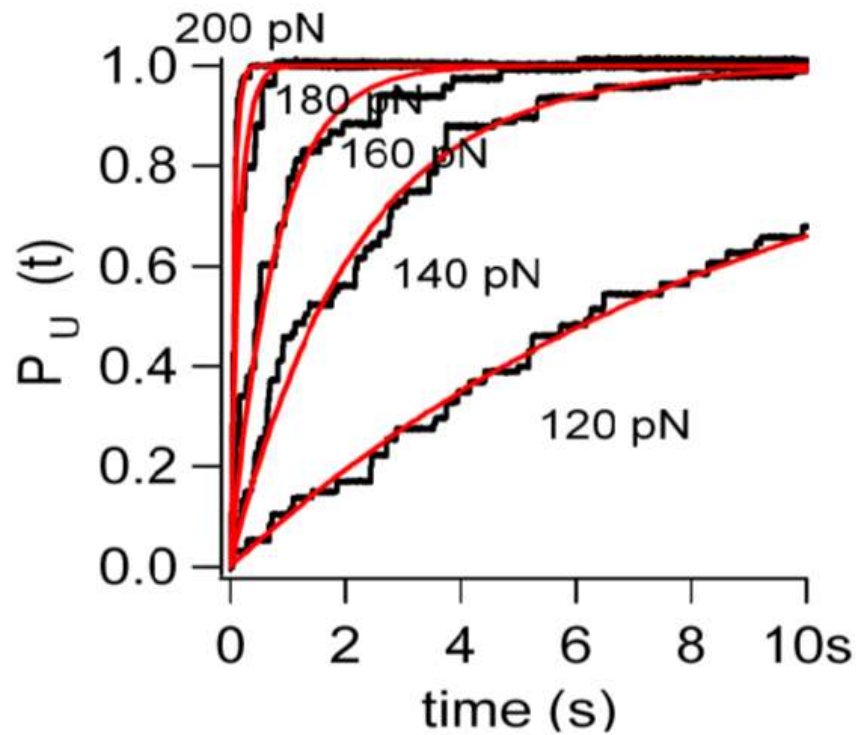
Medida de la cinética de desplegamiento



Suma de varias trazas individuales

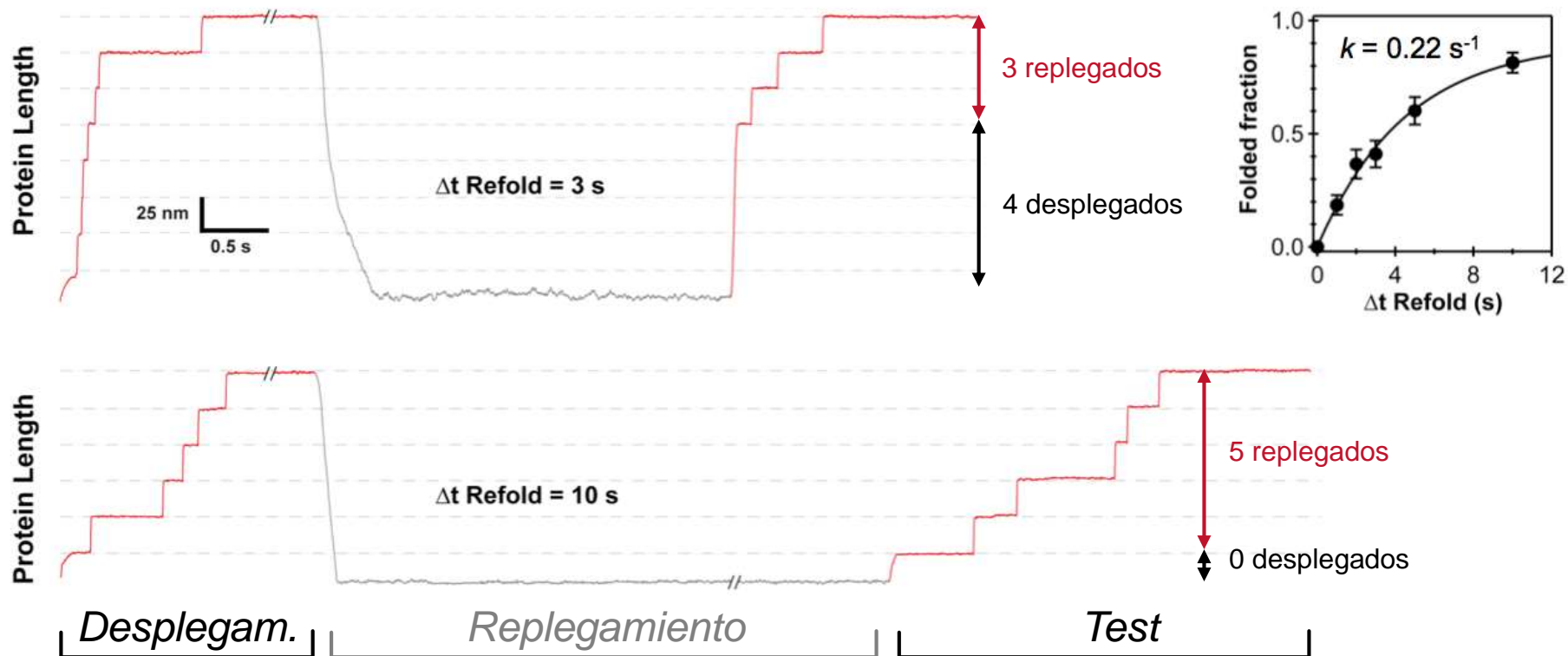


Caracterización del desplegamiento mecánico

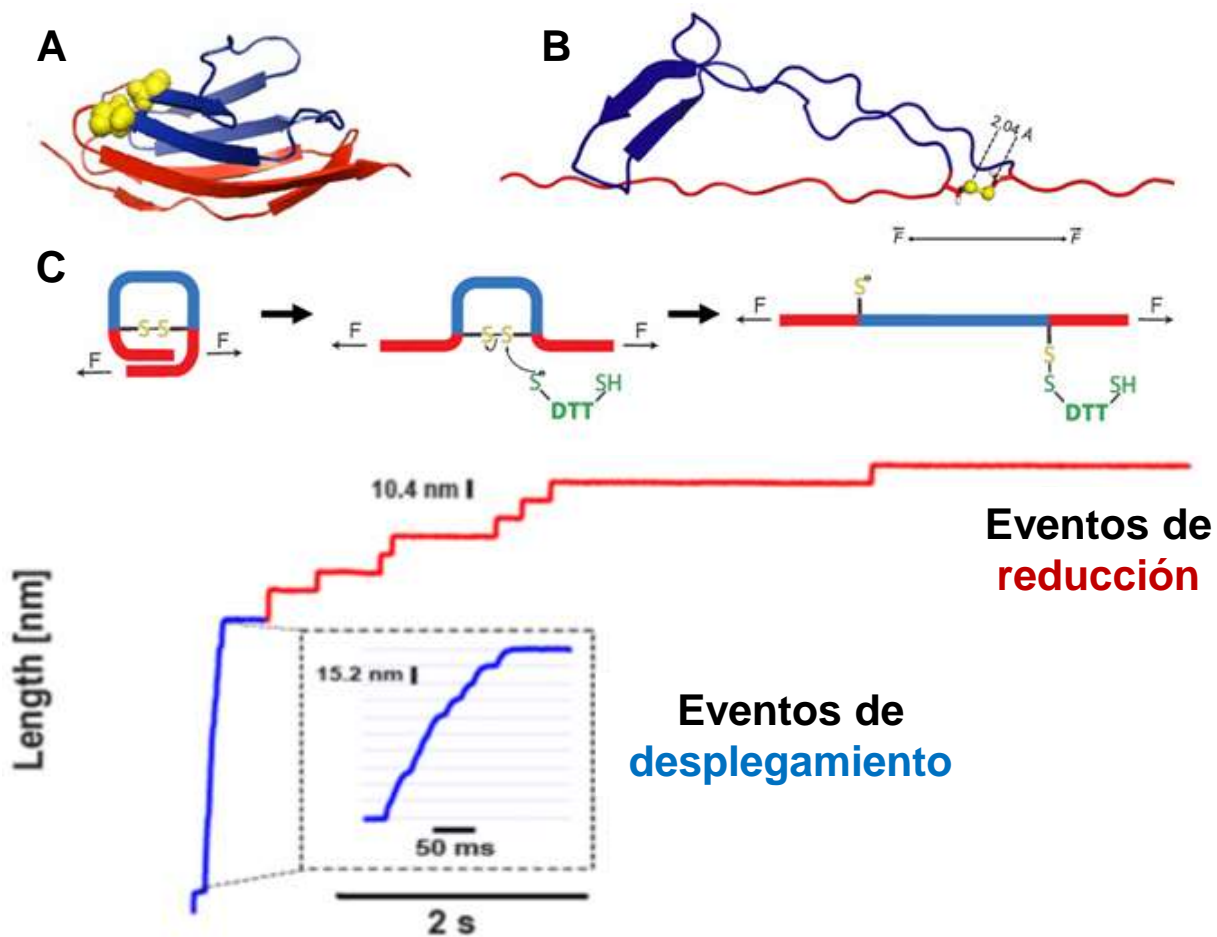


$$\Delta x_u = 2.4 \text{ \AA}$$

Estudios de replegamiento



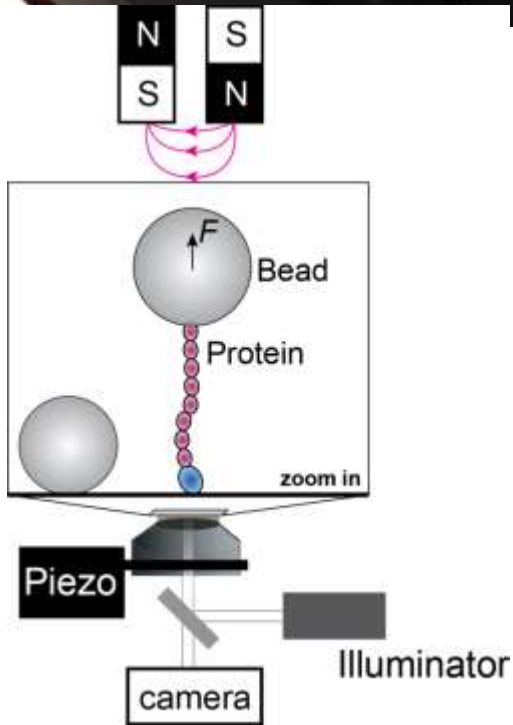
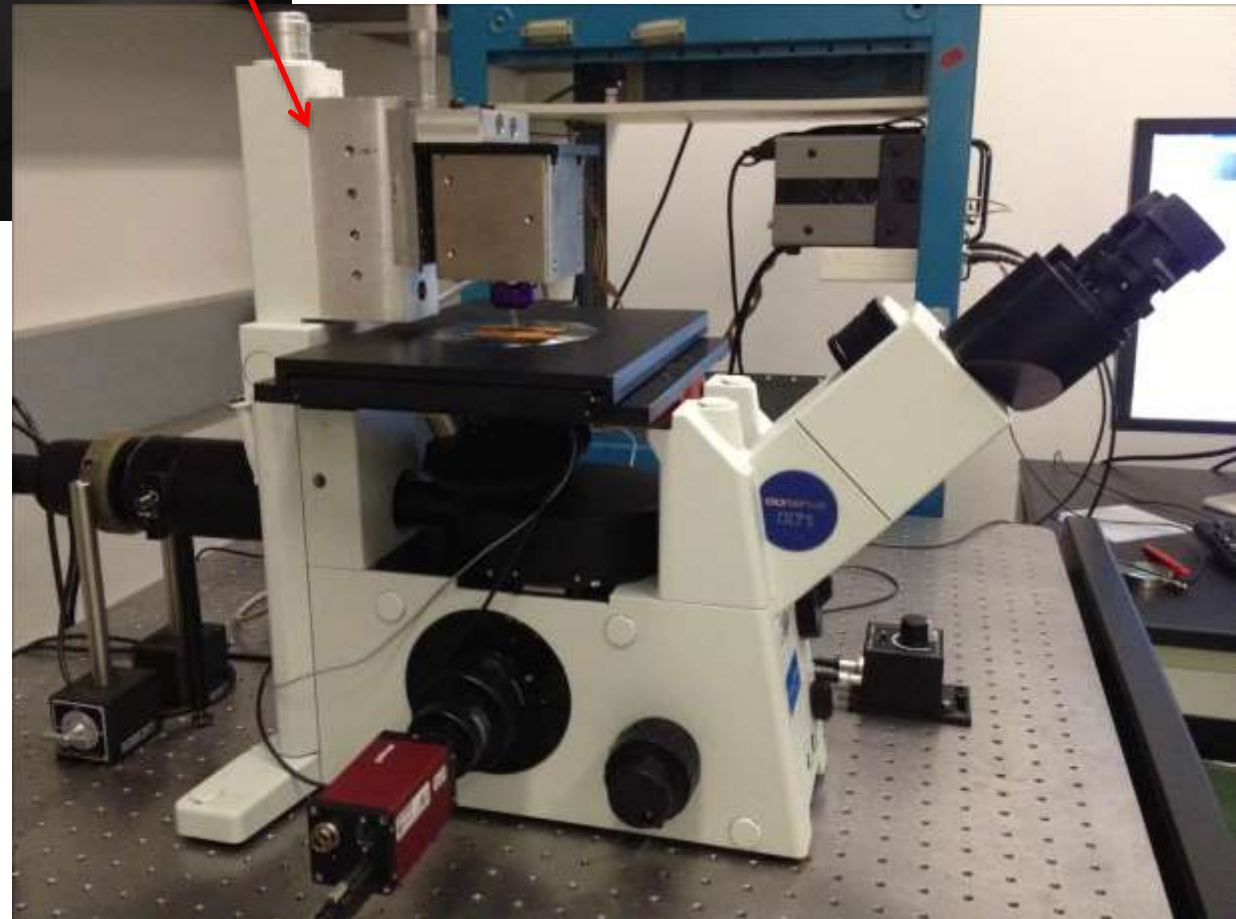
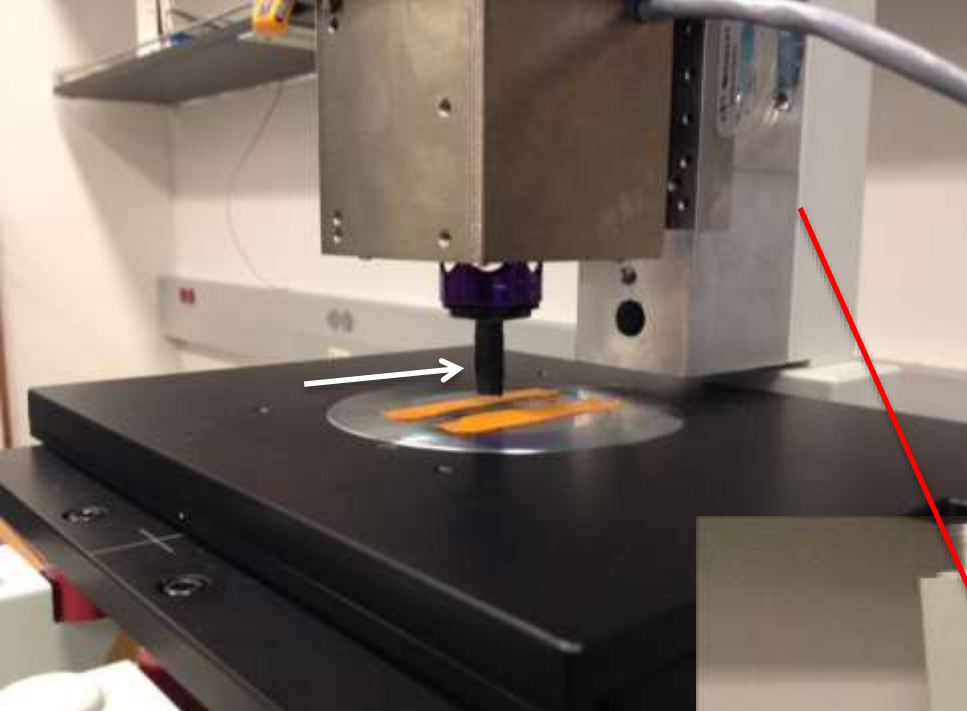
Estudio de reacciones químicas a nivel individual



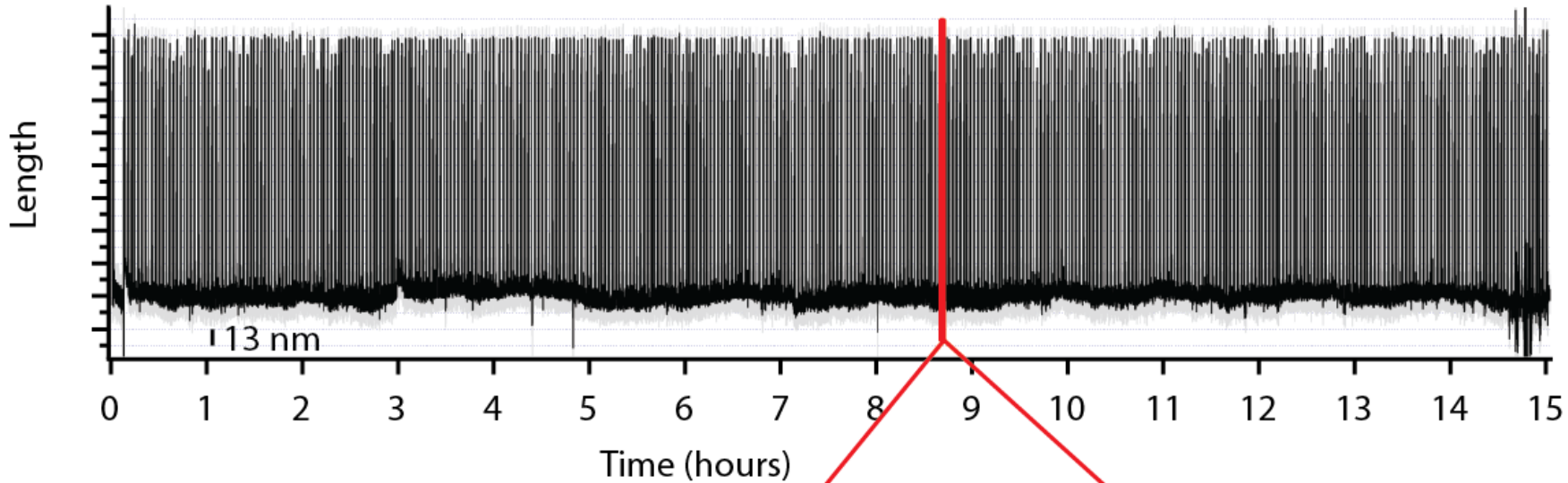
MT

Pinzas magnéticas aplicadas
al estudio de proteínas

Pinzas magnéticas



Ventajas e inconvenientes de las pinzas magnéticas

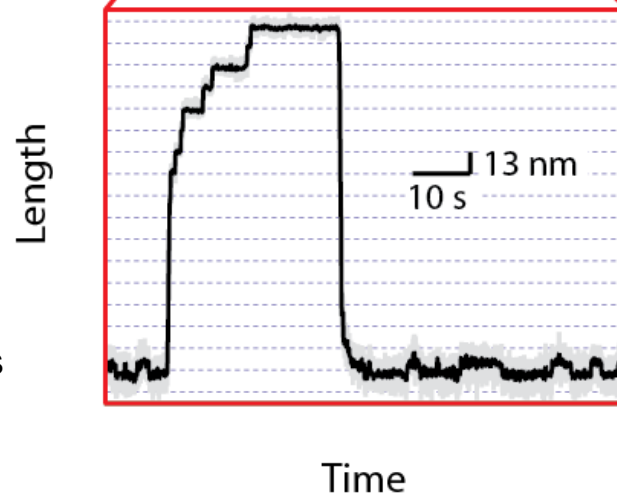


Ventajas

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

Inconvenientes

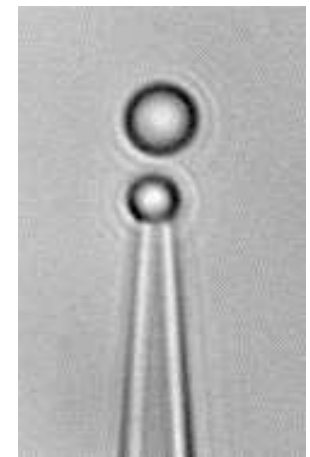
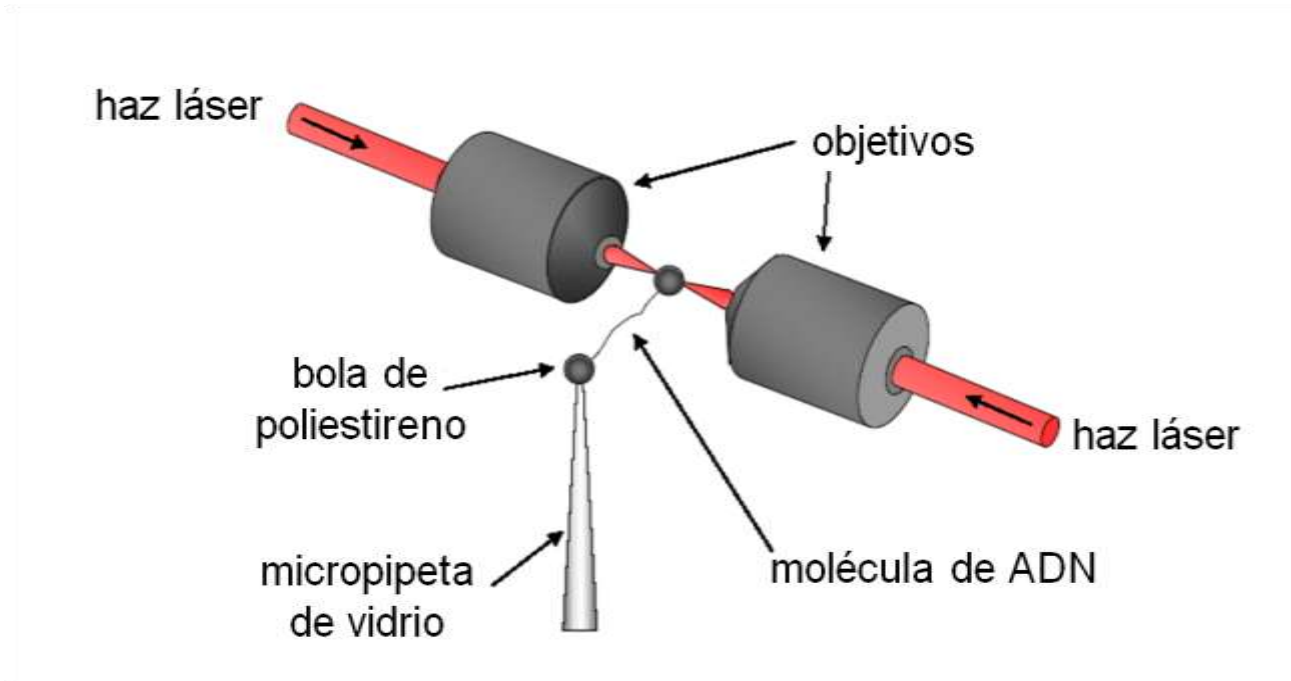
- Baja resolución temporal
- No adecuado para estudiar reacciones químicas
- No es comercial



OT

Pinzas ópticas aplicadas
al estudio de proteínas

El fundamento de las pinzas ópticas



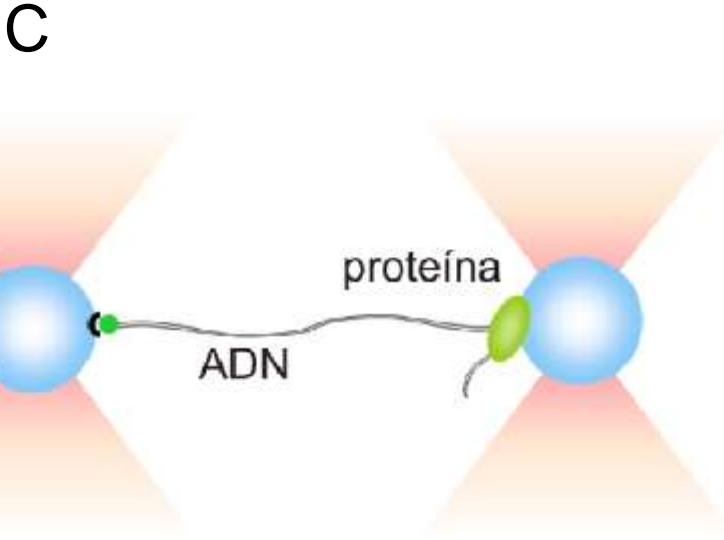
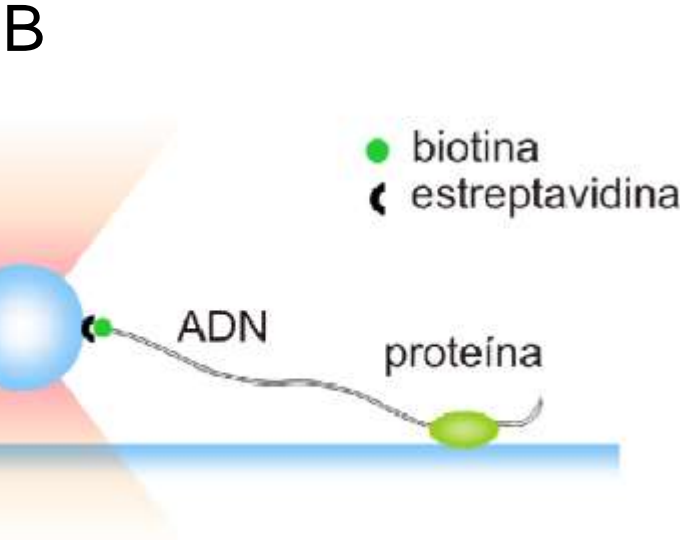
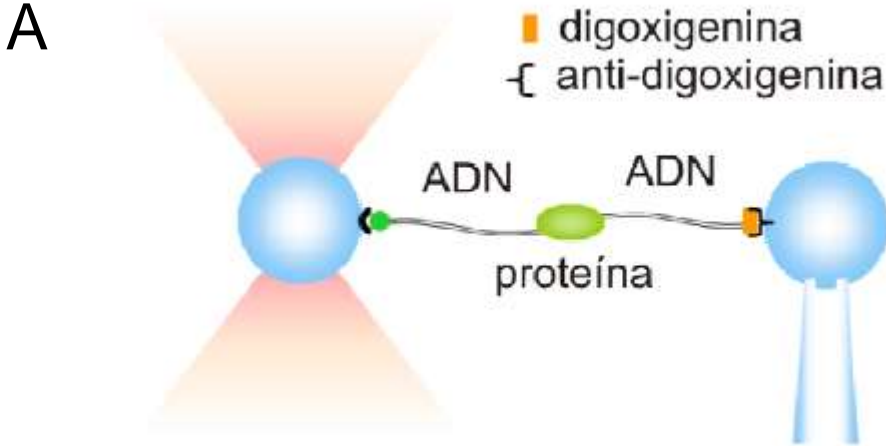
Ventajas

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

Inconvenientes

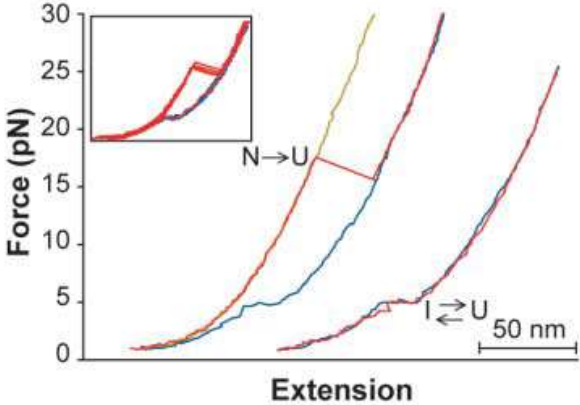
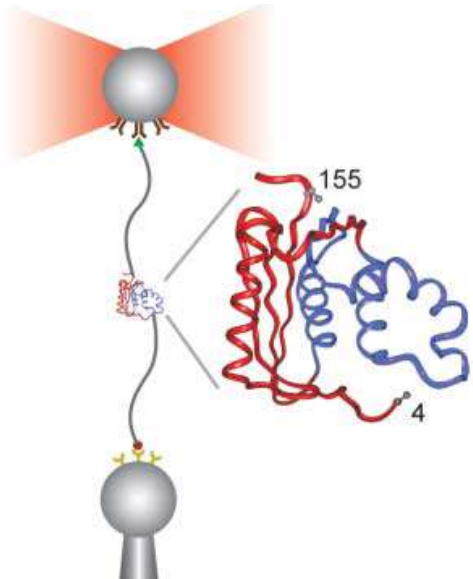
- No adecuado para mirar reacciones químicas
- Necesidad de usar asas moleculares
- Instrumentación compleja

Configuraciones experimentales

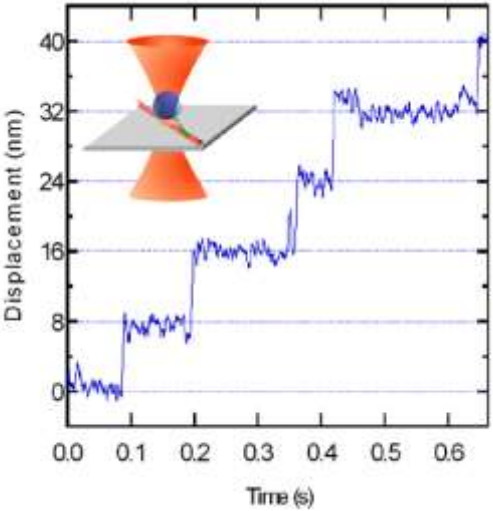
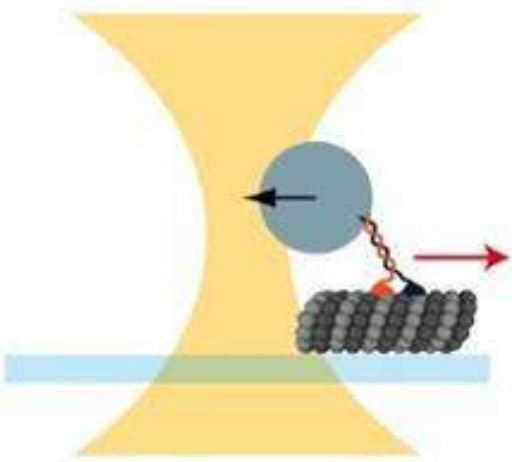


Algunos experimentos con pinzas ópticas

Desplegamiento/
replegamiento

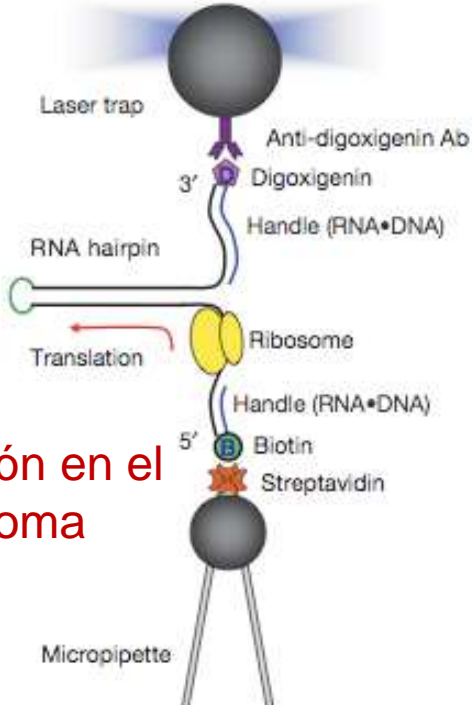
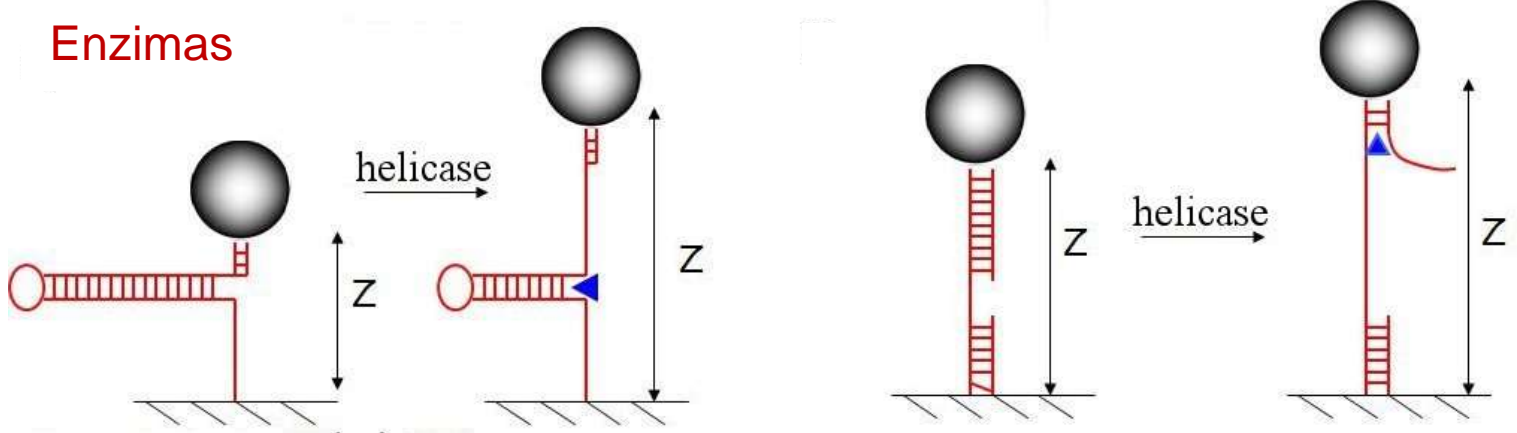


Motores
moleculares

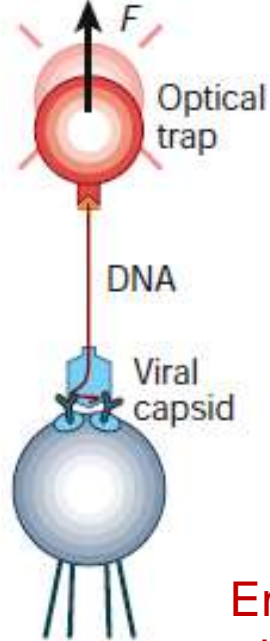


Estudio de **motores moleculares** mediante pinzas ópticas

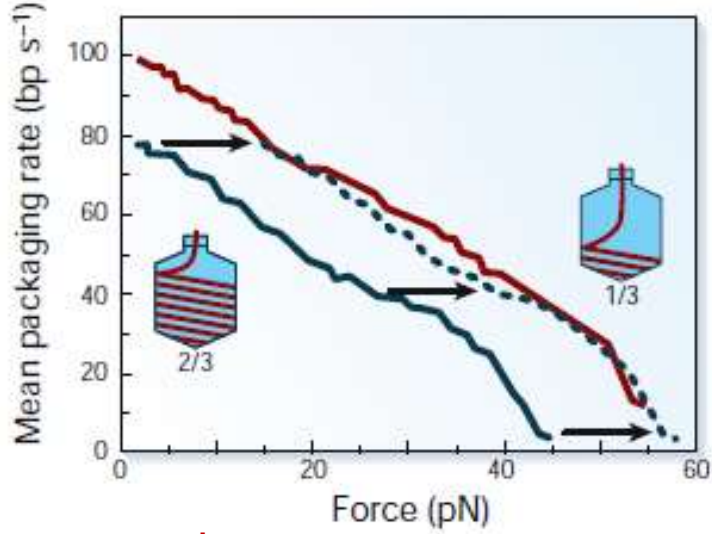
Enzimas



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.