

SEBBM DIVULGACIÓN

ACÉRCATE A NUESTROS CIENTÍFICOS



Biofísica molecular: el estudio individualizado de máquinas proteicas

DOI: http://dx.doi.org/10.18567/sebbmdiv_ANC.2018.10.1

Fernando Moreno Herrero
Centro Nacional de Biotecnología - CSIC, Madrid

Biografía **Resumen**

Fernando Moreno Herrero es Investigador Científico del CSIC en el Centro Nacional de Biotecnología (Madrid), licenciado en Ciencias Físicas por la Universidad de Oviedo (1998) y Doctor en Ciencias por la Universidad Autónoma de Madrid (2003). Su investigación se centra en el estudio de procesos de reparación, replicación y organización del ADN mediante técnicas biofísicas de molécula única. Sus trabajos han permitido dilucidar el mecanismo de resección del ADN por AddAB para su reparación por recombinación homóloga en bacterias (Mol. Cell, PNAS, NAR). Sus desarrollos de nuevos métodos en pinzas magnéticas han permitido descubrir nuevas funciones en proteínas o propiedades físicas de ácidos nucleicos (Small, NAR, PNAS, eLife). Autor de más de 65 publicaciones, e investigador principal de varios proyectos ERC (Starting 2007, PoC 2014, y Consolidator 2015), el Dr. Moreno-Herrero ha recibido diversos premios que demuestran el impacto de su investigación (UAM, SEBBM, SBE, y "Miguel Catalán" de la CAM).

Manipular y visualizar moléculas individuales es posible actualmente gracias a un conjunto de técnicas biofísicas que permiten monitorizar la actividad de máquinas proteicas que participan, por ejemplo, en replicación, transcripción, o mantenimiento y reparación del ADN. Estas operaciones sobre el ADN son fundamentalmente mecánicas y difíciles de investigar usando metodología bioquímica tradicional.

Summary

Manipulation and visualization of single molecules is now possible by means of a myriad of biophysical techniques that can capture the presence and activity of single protein machines involved, for instance, in replication, transcription, DNA maintenance and repair. These DNA transactions are mechanical by nature and difficult to approach with standard biochemical techniques.

<http://www.sebbm.es/HEMEROTECA>: http://www.sebbm.es/ES/divulgacion-ciencia-para-todos_10/acercate-a-nuestros-cientificos_107

Hoy sabemos que muchos de los enzimas que participan en el correcto funcionamiento y mantenimiento de la célula aparecen en un número muy reducido. Por lo tanto, a esta escala celular, cada una de estas macromoléculas cuenta y si queremos comprender un proceso biológico en su totalidad necesitamos estudiar la actividad de estas proteínas de forma individualizada. Además, resulta que muchos de los procesos biológicos que involucran ADN, son fundamentalmente mecánicos donde fuerzas de tensión y torsión, generadas por la actividad celular, desempeñan un papel importante. Por ejemplo el proceso de reparación de un corte de ADN por recombinación homóloga se describe como el resultado de una serie de eventos que siguen un orden secuencial. En primer lugar se procesa el corte para generar una cadena de ADN de hebra sencilla, luego se produce el proceso de invasión en la molécula de ADN homólogo, a continuación se sintetiza nuevo ADN y finalmente se resuelve la unión Holliday que se genera. Todos esos procesos los realizan un conjunto de proteínas que deben trabajar de forma coordinada y ordenada en el tiempo. Los métodos biofísicos de molécula única permiten manipular y observar biomoléculas de una en una y estudiar cómo la fuerza afecta a estos procesos biológicos. Esta metodología permite además estudiar procesos secuenciales en una población no sincronizada. Los métodos bioquímicos tradicionales adolecen de esta aproximación de molécula única porque promedian el comportamiento del conjunto de partículas, y por tanto ese comportamiento individual que puede ser relevante para la función biológica escapa a su medida. La biofísica molecular o el estudio individualizado de máquinas proteicas se inicia en los años 80 con la invención y posterior desarrollo de la microscopía de fuerzas (AFM) y de las Pinzas Ópticas (OT).

El AFM se desarrolló como una evolución natural del microscopio de efecto túnel (STM) cuyos inventores recibieron el premio Nobel en 1986. El AFM usa la fuerza existente entre una sonda afilada y una superficie para construir la imagen de un objeto (1). Conceptualmente, el procedimiento es similar al método que usa una persona ciega para leer con sus dedos pasándolos por encima de una superficie. La posibilidad de emplear el AFM para obtener imágenes de superficies aislantes (el STM trabaja con superficies (semi)conductoras) y en medio líquido (el STM trabaja en vacío) presentó al AFM como una técnica ideal para observar y estudiar materiales biológicos incluyendo ADN y proteínas (2-4).

De forma paralela se desarrolló la otra técnica fundamental de manipulación de moléculas únicas: la Pinzas Ópticas (5). Esta técnica está basada en la fuerza generada por la presión de radiación que ejerce la luz sobre objetos dieléctricos. Al focalizar un haz láser mediante un objetivo óptico es posible atrapar microesferas de plástico y aplicar fuerzas de decenas de piconewtons si desplazamos estas microesferas fuera de su posición de equilibrio. Esta técnica permitió al grupo de Block a principios de los 90 medir el movimiento de la kinesina sobre los microtúbulos (6) y determinar que se mueve dando pasos de 8 nm (7). El uso de microesferas de plástico para manipular material biológico derivó en los primeros experimentos mecánicos sobre el ADN usando partículas magnéticas realizado por el grupo de Bustamante (8) y en la invención de las Pinzas Magnéticas por parte del grupo de Bensimon y Croquette tal y como las conocemos hoy en día (9). Ambos grupos consiguieron medir la respuesta mecánica del ADN abriendo la puerta a estudiar motores moleculares que modifican la estructura del ADN: polimerasas, helicasas, topoisomerasas, enzimas de restricción, etc. (9-11). El término Pinzas Magnéticas se acuñó en analogía con su predecesor, las pinzas ópticas. Sin embargo las pinzas magnéticas, en realidad tiran de las microesferas mediante imanes en lugar de atraparlas. Esta peculiaridad supone una diferencia fundamental y es que es posible aplicar fuerzas a múltiples moléculas de ADN simultáneamente incrementando la eficiencia de las medidas, y también aplicar un torque sobre el ADN simplemente girando los imanes. Estas características convierten a las pinzas magnéticas en un instrumento extraordinariamente versátil para estudiar actividades enzimáticas dependientes de fuerza y torsión.

Durante los últimos años, estos instrumentos se han desarrollado enormemente consiguiendo mayor resolución y su combinación con otras técnicas como la microscopía de fluorescencia. Estos equipos combinados han permitido realizar experimentos muy complejos con resolución por debajo del nanómetro y fuerzas con precisión sub-pN. Nuevas tecnologías como la microscopía de super-resolución, las técnicas de secuenciación por fluorescencia, o el desarrollo de nanoporos biológicos o de estado sólido para secuenciación, no hubieran sido posibles sin el conocimiento previo que todo el desarrollo de técnicas de

molécula única ha proporcionado. El papel que grupos de (bio) físicos e ingenieros han jugado en el desarrollo de estas tecnologías ha sido fundamental y esto ha facilitado que hoy en día estén accesibles a muchos investigadores que trabajan en biomedicina y biotecnología.

Referencias:

1. Binnig, G., C. F. Quate, and C. Gerber. 1986. Atomic force microscope. *Phys. Rev. Lett.* 56:930-933.
2. Hansma, H. G., J. Vesenka, C. Siegerist, G. Kelderman, H. Morrett, R. L. Sinsheimer, V. Elings, C. Bustamante, and P. K. Hansma. 1992. Reproducible imaging and dissection of plasmid DNA under liquid with the atomic force microscope. *Science* 256:1180-1184.
3. Moreno-Herrero, F., M. de Jager, N. H. Dekker, R. Kanaar, C. Wyman, and C. Dekker. 2005. Mesoscale conformational changes in the DNA-repair complex Rad50/Mre11/Nbs1 upon binding DNA. *Nature* 437:440-443.
4. Yeeles, J. T., K. van Aelst, M. S. Dillingham, and F. Moreno-Herrero. 2011. Recombination hotspots and single-stranded DNA binding proteins couple DNA translocation to DNA unwinding by the AddAB helicase-nuclease. *Molecular Cell* 42:806-816.
5. Ashkin, A., and J. M. Dziedzic. 1987. Optical trapping and manipulation of viruses and bacteria. *Science* 235:1517-1520.
6. Block, S. M., L. S. Goldstein, and B. J. Schnapp. 1990. Bead movement by single kinesin molecules studied with optical tweezers. *Nature* 348:348-352.
7. Svoboda, K., C. F. Schmidt, B. J. Schnapp, and S. M. Block. 1993. Direct observation of kinesin stepping by optical trapping interferometry. *Nature* 365:721-727.
8. Smith, S. B., L. Finzi, and C. Bustamante. 1992. Direct mechanical measurements of the elasticity of single DNA molecules by using magnetic beads. *Science* 258:1122-1126.
9. Strick, T. R., J. F. Allemand, D. Bensimon, A. Bensimon, and V. Croquette. 1996. The elasticity of a single supercoiled DNA molecule. *Science* 271:1835-1837.
10. Smith, S. B., Y. Cui, and C. Bustamante. 1996. Overstretching B-DNA: the elastic response of individual double-stranded and single-stranded DNA molecules. *Science* 271:795-799.
11. Carrasco, C., N. S. Gilhooly, M. S. Dillingham, and F. Moreno-Herrero. 2013. On the mechanism of recombination hotspot scanning during double-stranded DNA break resection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:E2562-2571.

Figura. La figura representa un experimento de pinzas magnéticas donde un campo magnético (líneas paralelas) ejerce una fuerza sobre una microesfera magnética a la que se une una molécula de ADN. La proteína es una helicasa que abre la doble hebra del ADN y como consecuencia modifica la extensión de la molécula.

