

SEBBM DIVULGACIÓN

LA CIENCIA AL ALCANCE DE LA MANO



Jugando en el laboratorio con moléculas únicas

Jorge Alegre Cebollada

Dept. of Biological Sciences, Columbia University, Nueva York

Biografía

Siendo estudiante de la Licenciatura en Bioquímica, tuvo la suerte de ingresar en el grupo de química de proteínas del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I de la Universidad Complutense de Madrid, en donde completaría su formación predoctoral bajo la dirección de Álvaro Martínez del Pozo y José G. Gavilanes. Su tema de investigación se centró en el estudio del mecanismo de formación de poros en membranas por actinoporinas, unas toxinas producidas por anémonas de mar. Tras obtener el grado de doctor en marzo de 2008, se desplazó al laboratorio de Julio M. Fernández en la Universidad de Columbia (Nueva York, Estados Unidos), en donde desarrolla su tarea investigadora actualmente. Esta se centra en la aplicación de técnicas de espectroscopía de fuerza mediante AFM al estudio de reacciones químicas y de las propiedades mecánicas de diferentes proteínas.

<http://www.sebbm.es/>

HEMEROTECA:

http://www.sebbm.es/ES/divulgacion-ciencia-para-todos_10/la-ciencia-al-alcance-de-la-mano-articulos-de-divulgacion_29

SEBBM
SEBBM

Sociedad Española
de Bioquímica y
Biología Molecular

Resumen

En las últimas décadas, el desarrollo de técnicas que permiten la detección y manipulación de moléculas únicas está revolucionando nuestra manera de entender la biología molecular. En este artículo, se describen brevemente las técnicas de molécula única más extendidas a día de hoy.

Summary

In the last decades, the development of techniques that allow observing and manipulating single molecules has transformed the way we understand molecular biology. In this article, today's most popular single-molecule techniques are briefly described.

A comienzos del siglo XIX parecía claro que la materia estaba constituida por átomos que se combinan entre sí dando lugar a moléculas (1). El trabajo experimental desarrollado desde entonces ha hecho uso de este concepto de molécula, pero con un gran inconveniente. El número de moléculas analizado de modo simultáneo en un solo experimento raramente ha bajado de los miles de millones. Por tanto, los resultados experimentales obtenidos han representado, por lo general, un promedio de las propiedades de un número de moléculas comparable con el número de habitantes de la Tierra. Si tuviéramos que contestar a la pregunta “¿son los seres humanos guapos?” pasaríamos un mal rato si no nos dejaran clarificar que los hay

normales, guapos, y no tan guapos. Por motivos similares, para profundizar en el comportamiento y las propiedades de las moléculas, en las últimas décadas han proliferado técnicas que permiten el estudio de moléculas individuales, de una en una.

A día de hoy, contamos con dos tipos de experimentos de molécula única: de observación y de manipulación (2). En realidad, la observación de moléculas individuales se remonta al desarrollo del microscopio electrónico a partir de la década de 1930 (3). Sin embargo, esta técnica sólo es capaz de producir imágenes estáticas. Actualmente, la técnica más empleada para la observación dinámica de moléculas individuales es la denominada fluorescencia de molécula única, especialmente en su modalidad de transferencia de energía por resonancia (FRET). El fenómeno de la fluorescencia consiste en la emisión de luz de una determinada longitud de onda por parte de una molécula, denominada fluoróforo, tras absorber luz de distinta longitud de onda (4). En FRET, se hace uso de dos fluoróforos de propiedades cuidadosamente seleccionadas: la longitud de onda de la luz emitida por uno de ellos, el dador, coincide con la absorbida por el otro, el aceptor. Por tanto, si estos fluoróforos están próximos y son irradiados con la luz que absorbe el dador, se produce transferencia de energía entre ambos y la luz emitida que se detecta es la característica del aceptor. En un experimento estándar de FRET, se sitúa un par aceptor/dador en posiciones

específicas de una proteína (Figura 1A). Muchas proteínas, cuando realizan su función, sufren cambios estructurales. En el caso de una proteína marcada con un aceptor y un dador, estos cambios estructurales dan lugar a variaciones en la distancia que separa aceptor y dador, y por tanto, en cómo de eficaz es la transferencia de energía. Haciendo uso de diversos elementos ópticos, es posible detectar la emisión de fluorescencia producida por un solo fluoróforo. Por tanto, se tienen todos los ingredientes para observar, indiscretamente, el funcionamiento de una sola unidad de las máquinas más pequeñas que existen, las proteínas (5) (Figura 1B). En los experimentos de manipulación de moléculas únicas, es posible no sólo la observación de moléculas individuales, sino también la aplicación de fuerzas sobre ellas (6). Existen diversas configuraciones que hacen esto posible. Entre ellas, destacan la microscopía de fuerza atómica (AFM) y las pinzas ópticas. En ambas aproximaciones, se mantiene la molécula de interés entre dos soportes. El experimentador tiene control sobre la distancia que los separa. Además, uno de ellos actúa como sensor de fuerza. En el caso de la AFM, la muestra se deposita entre una punta microscópica y la superficie de un material piezoeléctrico, cuya extensión es controlable por voltaje

(Figuras 1C, 1D). El comportamiento de la punta de AFM, el sensor de fuerza en estos experimentos, se asemeja al de un pequeño muelle, por lo que su desplazamiento sobre la posición de equilibrio es proporcional a la fuerza ejercida sobre la molécula. En el caso de las pinzas ópticas, una pequeña esfera atrapada en un campo de fuerzas generado por un láser actúa como sensor de fuerza (Figura 1E). Una aplicación clásica de estos experimentos es el estudio de las propiedades mecánicas de proteínas. Esta información es útil, por ejemplo, para entender cuál es la arquitectura molecular que permite la función del tejido muscular (7). En los últimos años, se ha comprobado que también resulta de interés el estudio bajo fuerza de moléculas que no necesariamente están sometidas a tensiones mecánicas en condiciones fisiológicas. La fuerza, en este caso, introduce una perturbación en el sistema que da lugar a nueva información acerca de sus propiedades, del mismo modo que las técnicas de espectroscopía permiten una mejor comprensión de la estructura de la materia. En este sentido, se ha popularizado el término “espectroscopía de fuerza” para hacer referencia a la manipulación mediante fuerza de moléculas individuales. Las técnicas de molécula única están revolucionando nuestro modo

de entender la biología molecular; sin embargo, todavía estamos lejos de comprender cómo las propiedades de moléculas individuales sustentan el fenómeno de la vida. Esa será una de las tareas de las próximas generaciones de científicos.

Referencias

1. <http://en.wikipedia.org/wiki/Molecula>
2. Ritort, F. 2006. Single-molecule experiments in biological physics: methods and applications. *Journal of Physics-Condensed Matter* 18:R531-R583.
3. http://en.wikipedia.org/wiki/Electro_n_microscope
4. <http://en.wikipedia.org/wiki/Fluore-science>
5. Roy, R., S. Hohng, y T. Ha. 2008. A practical guide to single-molecule FRET. *Nat Methods* 5:507-516.
6. Bustamante, C., Y. R. Chemla, N. R. Forde, y D. Izhaky. 2004. Mechanical processes in biochemistry. *Annu Rev Biochem* 73:705-748.
7. Li, H., W. A. Linke, A. F. Oberhauser, M. Carrión-Vázquez, J. G. Kerkvliet, H. Lu, P. E. Marszalek, y J. M. Fernández. 2002. Reverse engineering of the giant muscle protein titin. *Nature* 418:998-1002.

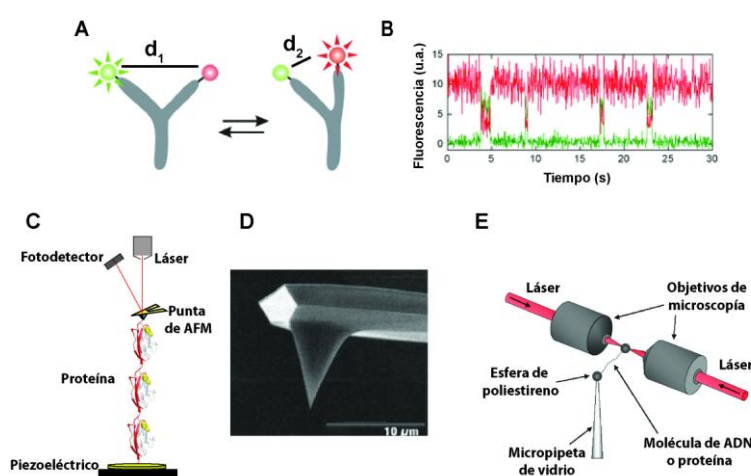


Figura- (A) Una molécula que actúa de dador (verde) y otra de aceptor (rojo) se incorporan en una proteína. Si la conformación de ésta es tal que la distancia entre ambos fluoróforos es grande (d_1), la eficacia de FRET es baja, y por tanto, se detecta mayoritariamente la fluorescencia procedente del dador. En cambio, si ambos fluoróforos se aproximan (d_2), se produce la transferencia de energía y se detecta la fluorescencia correspondiente al aceptor. (B) Trazo experimental correspondiente al esquema representado en la parte A. En él se puede observar cómo la proteína fluctúa entre dos estados. La mayor parte del tiempo lo pasa en el estado d_2 (fluorescencia roja), pero ocasionalmente los fluoróforos se alejan al estado d_1 y la transferencia de energía se hace menos eficaz. (C) Esquema experimental para la espectroscopía de fuerza mediante AFM. (D) Imagen obtenida mediante microscopía electrónica de barrido de una punta de AFM. (E) Esquema experimental de la espectroscopía de fuerza mediante pinzas ópticas.