

Tópicos en Biofísica Molecular

2do Cuatrimestre de 2013

Docentes: Lía Pietrasanta y Catalina von Bilderling

Práctica de laboratorio n° 5: Microscopía de Fuerza Atómica

OBJETIVOS

Identificar las partes y familiarizarse con el funcionamiento del Microscopio de Fuerza Atómica. Obtener imágenes de topografía de muestras biológicas. Utilizar al AFM para desplegar la proteína Fibronectina. Analizar las curvas de fuerza resultantes y determinar los parámetros biológicos relevantes (longitud de contorno y fuerza característica).

INTRODUCCIÓN

El Microscopio de Fuerza Atómica (AFM) fue desarrollado en 1986 por Binnig, Quate y Gerber [1] para vencer una limitación importante de su predecesor, el Microscopio de efecto túnel (STM). Mientras el STM requiere que las muestras sean conductoras, el AFM abrió las puertas al estudio de muestras no conductoras y en especial de muestras biológicas dada su capacidad de trabajar también en presencia de líquido.

El principio de operación del AFM se basa en hacer barrer una punta extremadamente filosa sobre (en contacto o a una distancia muy próxima) la muestra que se quiere estudiar. Las dimensiones usuales de esta punta son de algunos micrones de alto y menos de 10 nm de diámetro, y su ubicación en el extremo libre de un fleje o cantilever permite que pueda detectarse la deflexión del mismo durante el barrido para obtener una imagen de la topografía de la muestra. En la Figura 1a se presenta una fotografía del microscopio, que consta básicamente de tres partes: base, barredor (de ahora en adelante scanner) y cabeza. El scanner es un piezoeléctrico tubular que permite mover la muestra colocada sobre él en las tres direcciones. La cabeza posee un diodo láser, un espejo y un fotodetector. Dentro de la cabeza se coloca una pieza que sirve como soporte para el sensor de fuerza. La parte posterior de la punta es iluminada con el láser y el reflejo del mismo en el detector de cuatro cuadrantes permite medir la deflexión del extremo libre del cantilever (Fig. 1b). Un lazo de realimentación permite ajustar durante el barrido la distancia punta-muestra de manera de evitar el riesgo de dañar la punta.

Existen dos modos básicos para la obtención de imágenes de topografía, según se mida la deflexión estática o la oscilación dinámica del cantilever:

- *Modo Contacto*

El modo contacto (del inglés, Contact Mode) del AFM opera barriendo la punta en las direcciones x e y en contacto permanente con la muestra. Durante la medición el ciclo de retroalimentación mantiene constante la deflexión del cantilever ajustando la posición vertical de la muestra con el escáner. El parámetro que regula el valor de la deflexión es el Deflection Setpoint, que determina el valor de deflexión al que se debe mantener el cantilever. El aumento de este parámetro hace que por la ley de Hooke (si consideramos al cantilever como un fleje elástico de constante K, F la fuerza y d la

deflexión: $F = -K \cdot d$), se realice sobre la muestra una fuerza mayor. La imagen topográfica de la muestra se obtiene graficando este desplazamiento vertical del escáner para cada punto (x, y) . Se generan también imágenes de la deflexión para cada punto, que no proporcionan información cuantitativa pero suelen presentar mayor contraste en los bordes de la muestra.

• *Modo Contacto Intermitente*

En el modo de contacto intermitente u oscilante (del inglés, *Tapping Mode*) el *cantilever* oscila, por lo general con a una frecuencia cercana a su frecuencia de resonancia. Cuando se aproxima o se aleja de la superficie de la muestra, la amplitud de la oscilación cambia debido a la interacción entre la sonda y el campo de fuerza de la muestra. En este caso escáner ajusta la altura z a través del lazo de realimentación para mantener una amplitud constante, lo que hace que la sonda permanezca a una distancia fija de la muestra. El parámetro que determina el valor de amplitud en el que debe mantenerse la oscilación es el *Amplitude Setpoint*. Cuanto mayor es este parámetro es mayor la amplitud y por lo tanto mayor la distancia punta-muestra. Asociadas a este modo se pueden obtener también las señales de la amplitud o de la fase de la oscilación para cada punto del barrido, generando cada una de ellas imágenes con diferentes contrastes que suman información al estudio.

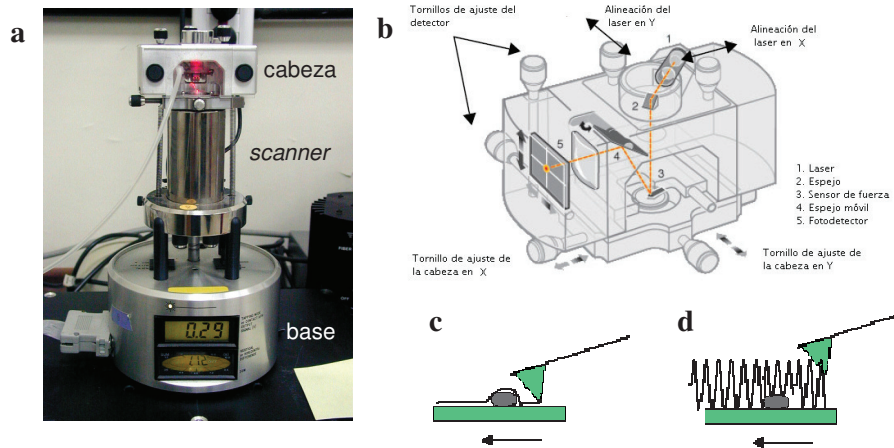


Figura 1. Microscopio de Fuerza Atómica. (a) Fotografía del AFM que utilizaremos en la práctica (*Multimode de Veeco*). (b) Esquema de la cabeza y el sistema de detección óptica. (c) Esquema modo contacto. (d) Esquema modo contacto intermitente.

AFM para la medición de fuerzas

El AFM permite medir con mucha precisión la deflexión del fleje o *cantilever* del que pende la punta sensora. Si se considera que el *cantilever* cumple la ley de Hook, esa deflexión d puede traducirse, a través de la constante elástica K del *cantilever*, en la fuerza de interacción F entre la punta y la muestra: $F = -K \cdot d$.

Una de las alternativas que ofrece el AFM es por lo tanto la técnica denominada *Espectroscopia de Fuerza* (FS), que aborda el estudio de fuerzas de interacción entre sistemas moleculares que puedan disponerse en la punta y/o como muestra del AFM. Las fuerzas de interacción se miden a partir de un ciclo conocido como *curva de fuerza* (**Fig. 2**), en el que la punta se acerca a la muestra, toma contacto y ejerce presión sobre

la misma, y finalmente se aleja luego de romper la interacción. Se puede medir la fuerza de interacción entre la punta y la muestra como la diferencia entre el valor de fuerza antes de tocar la muestra y el valor en el que se desprende la punta de la muestra en el ciclo de retracción.

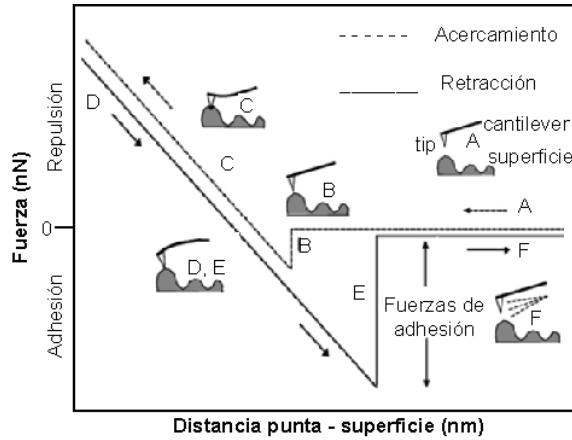


Figura 2. Esquema de una curva de fuerza.

Espectroscopía de fuerza de proteínas modulares

Un experimento típico de FS aplicada al estudio de una proteína modular se esquematiza en la **Figura 3a**. La proteína polimérica es inmovilizada en un sustrato generalmente de oro, ya sea por adsorción pasiva o por la interacción de algún residuo cisteína específicamente localizado en la proteína cuyos átomos de azufre se unen covalentemente al oro. La proteína así inmovilizada se une a la punta del sensor de fuerza de nitruro de silicio al tomar contacto la punta con la muestra, por un mecanismo no específico llamado fisisorción. A medida que la punta se retrae, a una dada velocidad de retracción, de la muestra los eventos distintivos del desplegamiento de la proteína se identifican en la curva de fuerza por su patrón característico. Las curvas de fuerza que resultan de la extensión de proteínas modulares presentan un patrón característico que tiene forma de dientes de sierra, una serie de picos regularmente espaciados (**Fig. 3b**) donde cada pico corresponde al desplegamiento de un dominio.

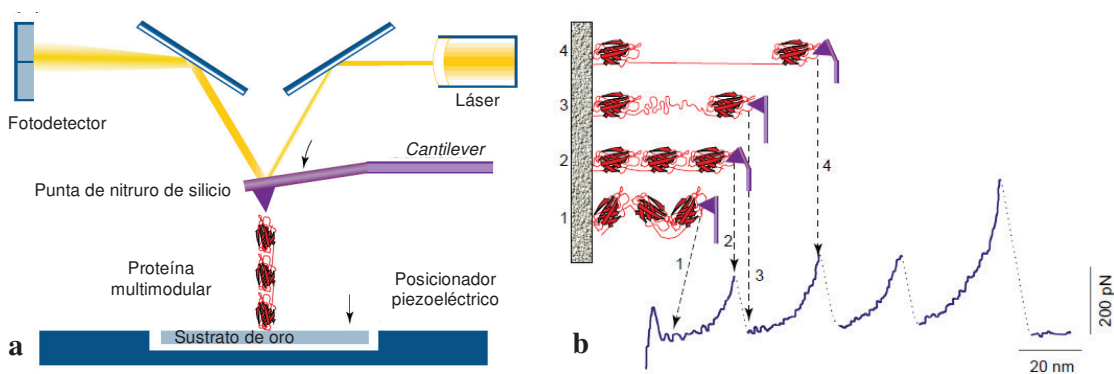


Figura 3. (a) Esquema del AFM para el desplegamiento de una proteína multimodular. (b) Curva de fuerza que presenta el característico patrón *dientes de sierra*. Tomado de [2].

DESARROLLO DE LA PRÁCTICA

A. Imágenes

1. Identificar las partes del AFM. Montar el sensor de fuerza y alinear la deflexión del láser en el detector de cuatro cuadrantes.
2. Preparar una muestra de ADN mediante el siguiente protocolo:
 - Preparar una solución de ADN 2 ng/μl en agua MilliQ.
 - Clivar una capa de la mica montada en disco metálico.
 - Colocar una gota de 20 μl de la solución sobre la mica y dejar por 5 minutos.
 - Enjuagar con agua MilliQ y secar con nitrógeno.
3. Montar la muestra en el microscopio y comenzar a medir. Ajustar los valores de *Setpoint* y ganancias para obtener imágenes adecuadas de las moléculas individuales.

B. Desplegado de la proteína Fibronectina

1. Preparar la muestra de Fibronectina mediante el siguiente protocolo:
 - Preparar una solución de Fibronectina 100μM en PBS.
 - Colocar una gota de 20 μl de la solución sobre un sustrato de oro Robax y dejar por 5 minutos.
 - Enjuagar con PBS, NO SECAR.
2. Montar la muestra en el microscopio utilizando la celda para trabajo en medio líquido.
3. Obtener curvas de fuerza de despliegado de la proteína.

C. Análisis de las curvas de fuerza.

A través del análisis de las curvas de extensión de la molécula de fibronectina se puede estudiar la estructura de dominios de la proteína y obtener en cada ciclo de fuerza información relevante de la misma como son, la cantidad de dominios desplegados, el orden en que se despliegan y los valores de fuerza necesaria para desenrollar cada dominio. Además del valor de fuerza, resulta de gran interés cuantificar otra magnitud características de cada dominio desplegado: la longitud de contorno o longitud total del dominio.

La fuerza característica para desenrollar cada dominio puede obtenerse directamente de la curva de fuerza a través de los valores de los mínimos. Para la obtención de la longitud de contorno es necesario realizar un ajuste de la curva mediante el modelo *Worm-like Chain* (WLC) [2]. El modelo WLC (que se traduce del inglés como “cadena con forma de gusano”) considera a la molécula como una cuerda relativamente flexible, compuesta por un material continuo, homogéneo e isótropo, que describe una curva en el espacio. La ecuación que describe la fuerza (F) en función de la extensión de la molécula (x) es:

$$F(x) = \frac{k_B T}{l_p} \left[\frac{1}{4} \left(1 - \frac{x}{L_c} \right)^{-2} + \frac{x}{L_c} - \frac{1}{4} \right],$$

donde k_B es la constante de Boltzmann, T la temperatura y L_C la longitud de contorno o longitud total de la cadena ($L_c = Na$). l_p se define como la longitud de persistencia de la cadena, y es una propiedad intrínseca del polímero en un medio determinado. Este parámetro refleja la flexibilidad de la cadena: cuanto menos es la longitud de persistencia, mayor es la entropía del polímero y su resistencia a ser extendido.

Es importante tener en cuenta que la extensión de la molécula (x) se obtiene de restar a la distancia movida por el piezoeléctrico la deflexión del *cantilever*. Es decir, si d es la deflexión y z denota el movimiento vertical del piezoeléctrico, en cada punto de la curva la variable x se obtiene de $x = z - d$.

1. Graficar las curvas de fuerza en función de extensión de la molécula y medir los valores de fuerza característica de cada pico.
2. Ajustar el desplegado de cada dominio con el modelo WLC y obtener las longitudes de contorno.

REFERENCIAS

[1] G. Binning, C. F. Quate, Ch. Gerber. *Phys. Rev. Lett.* **56** (9), 930, (1986).

[2] Thomas E. Fisher, Andres F. Oberhauser, Mariano Carrion Vazquez, Piotr E. Marzalek y Julio M. Fernández, *TIBS*, **24**, 389, (1999).

[3] *Handbook of Molecular Force Spectroscopy*. Editor Aleksandr Noy. Editorial Springer.